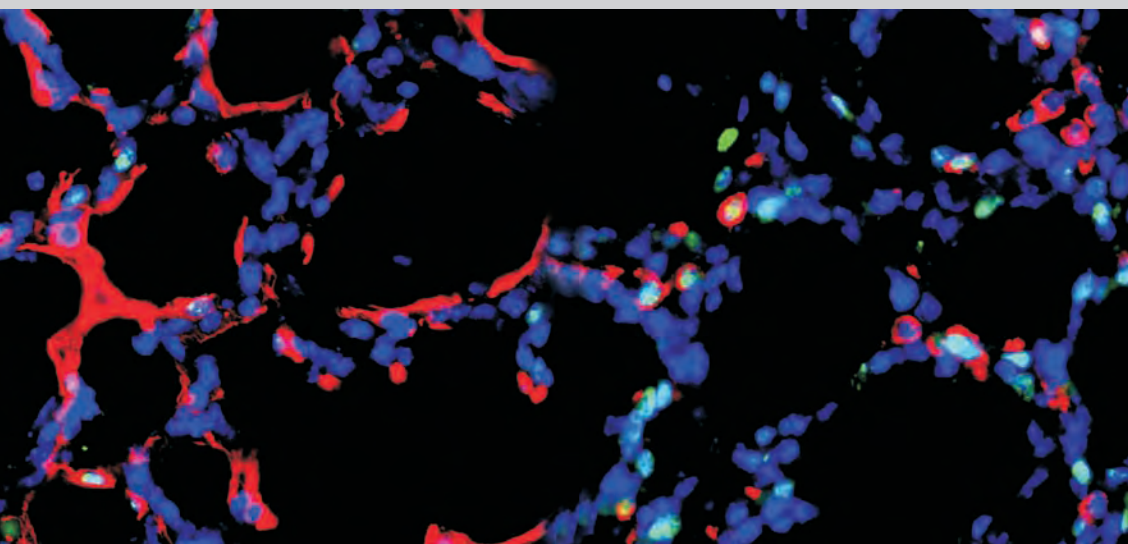


Untersuchung zur Proliferation verschiedener Zelltypen
während postnataler und Post-Pneumektomie-
Alveolarisierung in der C57Bl6/J – Maus

Timm Schäfer



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Untersuchung zur Proliferation verschiedener Zelltypen
während postnataler und Post-Pneumektomie-
Alveolarisierung in der C57Bl6/J – Maus**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Timm Schäfer

aus Dorsten

Gießen, 2011

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

und

dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim

Direktor: Prof. Dr. med. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. K. T. Preissner

Tag der Disputation: 21.11.2011

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Anatomische und embryologische Grundlagen | 3 |
| 1.1.1 | Anatomische Grundlagen der Lunge..... | 3 |
| 1.1.2 | Die allgemeine Embryonal- und Fetalentwicklung der Lunge ... | 6 |
| 1.1.3 | Postnatale Lungenentwicklung..... | 9 |
| 1.1.4 | Die postnatale Entwicklung der murinen Lunge | 12 |
| 1.1.4.1 | Die postnatale Proliferation der untersuchten Zelltypen | 13 |
| 1.2 | Das kompensatorische Lungenwachstum..... | 14 |
| 1.2.1 | Charakteristika des kompensatorischen Lungenwachstums in der Maus..... | 15 |
| 1.2.2 | Proliferationskinetik im kompensatorischen Lungenwachstum | 16 |
| 1.2.3 | Modulatoren des kompensatorischen Lungenwachstums | 18 |
| 1.2.3.1 | Altersspezifische Unterschiede | 18 |
| 1.2.3.2 | Mechanische Dehnung und erhöhter Blutfluss | 19 |
| 1.3 | Ziele der Arbeit | 21 |
| 2 | Material und Methoden | 22 |
| 2.1 | Material..... | 22 |
| 2.1.1 | Experimentelle Agenzien und Utensilien..... | 22 |
| 2.1.2 | Immunfluoreszenz-Antikörper | 23 |
| 2.1.3 | Histologie-Bedarf..... | 23 |
| 2.1.4 | Operations- und Präparationsmaterialien, Pharmaka | 23 |
| 2.1.5 | Groß-Geräte | 24 |
| 2.1.6 | Zusammensetzung verwendeter Lösungen | 26 |
| 2.2 | Methoden | 28 |
| 2.2.1 | Postnatales Lungenwachstum | 28 |
| 2.2.2 | Kompensatorisches Lungenwachstum..... | 28 |
| 2.2.3 | Aufbau des Arbeitsplatzes für die Pneumektomie..... | 29 |
| 2.2.4 | Aufbau des Narkose-Systems..... | 29 |
| 2.2.5 | Durchführung der Pneumektomie | 30 |
| 2.2.6 | Aufbau des Arbeitsplatzes für die Lungenfixierung | 32 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.2.7 | Fixierung der Lunge..... | 33 |
| 2.2.7.1 | Fixierung der Lungen pneumektomierter Tiere | 34 |
| 2.2.7.2 | Fixierung der Lungen postnataler Tiere | 34 |
| 2.2.8 | Immunhistochemische Färbungen | 36 |
| 2.2.9 | Erhebung der Proliferationsraten | 38 |
| 3 | Ergebnisse | 39 |
| 3.1 | Quantifizierung der Proliferation | 39 |
| 3.1.1 | PCNA-Färbung proliferierender Zellen | 39 |
| 3.1.2 | Detektion von Bronchialepithelzellen durch Cytokeratin-Färbung | 40 |
| 3.1.3 | Darstellung von Typ II Alveolarepithelzellen anhand von Prosurfactant-Protein C | 41 |
| 3.1.4 | Darstellung von Myofibroblasten anhand von α – Smooth Muscle-Actin | 42 |
| 3.2 | Qualitative Darstellung von Lipofibroblasten | 43 |
| 3.3 | Statistische Auswertung | 45 |
| 3.3.1 | Globale Proliferationsraten | 45 |
| 3.3.1.1 | Globale Proliferation im postnatalen Lungenwachstum | 45 |
| 3.3.1.2 | Vergleich zwischen zentralen und subpleuralen Arealen | 46 |
| 3.3.1.3 | Globale Proliferation beim kompensatorischen Lungenwachstum | 47 |
| 3.3.1.4 | Globale Proliferationsraten zentraler und subpleuraler Areale nach Pneumektomie | 48 |
| 3.3.1.5 | Vergleich der globalen Proliferationsraten bei postnatalem und post-PNX / -Sham-Lungenwachstum | 49 |
| 3.3.1.6 | Vergleich der globalen Proliferationsraten im postnatalen Lungenwachstum und nach Pneumektomie/ Sham-Operation in zentralen und subpleuralen Arealen | 50 |
| 3.3.2 | Zelltyp-spezifische Proliferationsraten | 53 |
| 3.3.2.1 | Typ II Alveolarepithelzellen (AE2) | 53 |
| 3.3.2.1.1 | Globale Proliferationsraten | 53 |
| 3.3.2.1.2 | Postnatale zentrale und subpleurale Proliferationsraten | 54 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.3.2.1.3 | Zentrale und subpleurale Proliferationsraten pPNX / Sham-Operation..... | 55 |
| 3.3.2.2 | Myofibroblasten (MF) | 57 |
| 3.3.2.2.1 | Globale Proliferationsraten..... | 57 |
| 3.3.2.2.2 | Postnatale zentrale und subpleurale Proliferationsraten..... | 58 |
| 3.3.2.2.3 | Zentrale und subpleurale MF-Proliferationsraten nach PNX / Sham-Operation | 59 |
| 3.3.2.3 | Bronchialepithelzellen (BE) | 60 |
| 3.3.2.3.1 | Globale Proliferationsraten..... | 60 |
| 3.3.2.3.2 | Postnatale zentrale und subpleurale Proliferationsraten..... | 62 |
| 3.3.2.3.3 | Zentrale und subpleurale BE-Proliferationsraten nach PNX / Sham-Operation | 62 |
| 3.3.2.4 | Vergleich der globalen Proliferationsraten aller untersuchter Zelltypen postnatal | 63 |
| 3.3.2.5 | Vergleich der globalen Proliferationsraten aller untersuchter Zelltypen nach Pneumektomie / Sham-Operation..... | 65 |
| 4 | <i>Diskussion</i> | 66 |
| 4.1 | Bisherige Untersuchungsmethoden | 66 |
| 4.2 | Vergleich der Lungenwachstumsmodi | 69 |
| 4.2.1 | Postnatale Lungenentwicklung..... | 69 |
| 4.2.2 | Post-Pneumektomie Lungenwachstum..... | 70 |
| 4.3 | Aspekte für die zukünftige Forschung | 72 |
| 4.4 | Das kompensatorische Lungenwachstum bei Menschen | 75 |
| 5 | <i>Zusammenfassung</i>..... | 77 |
| 6 | <i>Summary</i> | 79 |
| 7 | <i>Literaturverzeichnis</i> | 81 |
| 8 | <i>Anhang</i> | i |
| 8.1 | Abkürzungen | i |
| 8.2 | Lebenslauf..... | iv |
| 9 | <i>Danksagung</i> | vi |

1 Einleitung

Die zentrale Funktion der Lunge ist der Gasaustausch. Alveoläre und kapilläre Oberflächen dienen dabei als anatomische Grundbausteine, die die O₂-Aufnahme und CO₂-Abgabe des Blutes ermöglichen.

Destruktion und Umbau der Alveolarstruktur spielen in der Pathophysiologie diverser pulmonaler Erkrankungen eine entscheidende Rolle. So kommt es bei der COPD, dem Lungenemphysem oder der zystischen Fibrose zum Verlust der Alveolarsepten. Des Weiteren sind Umbauprozesse alveolärer Wandstrukturen, die mit massiver Einschränkung der Gasaustauschkapazität der Lunge einhergehen, maßgeblich an der Pathogenese der Lungenfibrose beteiligt.

Säugetiere machen sich verschiedene physiologische Mechanismen zu Nutze, den Verlust von Gasaustauschfläche zu kompensieren. Es werden beispielsweise Reserve-Alveolarareale, die unter normalen Bedingungen nicht belüftet sind, mit in den Gasaustausch einbezogen, die Sauerstoff-Transportkapazität des Blutes wird angehoben und es kommt bei einigen Spezies zur Entstehung neuer Alveolarflächen (43). Die letztgenannte Rekonstruktion von Gasaustauschfläche, das so genannte kompensatorische Lungenwachstum, lässt sich im Labor nach unilateraler Pneumektomie beobachten. Es wurde bereits bei Kaninchen (21), Mäusen (52, 90), Ratten (10, 29, 30, 34), Frettchen (62) und Hunden (40) beschrieben. In den untersuchten Spezies zeigte sich ein ausgeprägtes, z. T. sogar vollständiges kompensatorisches Wachstum der verbleibenden Lungenlappen mit Wiederherstellung der normalen Lungenvolumina, Zellzahl und Organfunktion (40, 91). Die genauen molekularen Induktions- und Regulations-Mechanismen sowie die Kinetik der zellulären Proliferation und der alveolären Differenzierung im Rahmen der Neoalveolarisierung wie auch der Umbau und die Reparatur von geschädigtem, pulmonalem Gewebe sind bislang jedoch weitgehend unverstanden (15, 58).

Hinsichtlich der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ist das Modell des kompensatorischen Lungenwachstums nach unilateraler Pneumektomie

(PNX) möglicherweise eine gute Basis, diese Mechanismen zu charakterisieren, und Grundlagen für die zukünftige Forschung zu schaffen.

Obwohl die Maus einzigartige Möglichkeiten für die zukünftige Forschung, gerade auf genetischer Ebene, ermöglicht, ist sie in Bezug auf das kompensatorische Lungenwachstum weitgehend unerforscht. Am besten charakterisiert ist dieses, gemessen an der Anzahl bisheriger Veröffentlichungen, sicherlich bei der Ratte (10, 11, 15, 29, 30, 34, 50).

In dieser Studie soll die globale sowie die Zelltyp-spezifische Proliferation von Typ II Alveolarepithelzellen (AE2), Bronchialepithelzellen (BE) und alveolären Myofibroblasten (MF) zu verschiedenen Zeitpunkten des postnatalen Lungenwachstums sowie des kompensatorischen Lungenwachstums nach linksseitiger PNX in C57Bl6/J Mäusen. Dies soll dem besseren Verständnis des zeitlichen und räumlichen Beitrages der besagten Zelltypen zum Lungenwachstum dienen.

1.1 Anatomische und embryologische Grundlagen

1.1.1 Anatomische Grundlagen der Lunge

Die paarigen Lungen liegen im Thorax beidseits des Mediastinums in einer serösen Pleurahöhle.

Das Lungenparenchym wird durch die beiden Blätter der Pleura und den Pleuraspalt vom Thorax abgegrenzt. Die Pleura visceralis liegt dem Lungengewebe direkt auf. Sie geht am Lungenhilus kontinuierlich in die Pleura parietalis, die der Thoraxwand auskleidend aufliegt, über. Die hiläre Umschlagfalte der Pleura bildet das Ligamentum pulmonale. Histologisch besteht die Pleura aus einschichtigem, mit Mikrovilli besetztem Mesothel. Die beiden Serosablätter bilden die Cavitas pleuralis, einen mit wenigen Millilitern seröser Flüssigkeit gefüllten Spaltraum, der die Gleitbewegungen bei der Atemexkursion ermöglicht (33, 77).

Die Lungen der Maus können in verschiedene Lobi unterteilt werden: Die rechte Lunge besteht aus vier Lobi, genannt Lobus cranialis, medialis, caudalis und accessorius (kardialer Lappen). Die linke Lunge besteht aus nur einem Lobus (80).

Jeder Lappen wird von einem Bronchus versorgt. Dem Aufteilungsmodus des Bronchialbaumes folgend, lassen sich als nächste Gliederungseinheit die Lungensegmente (Segmenta bronchopulmonalia) abgrenzen. Sie werden jeweils von einem Segmentbronchus, begleitet von einem Ast der A. pulmonalis, versorgt. Das desoxygenierte Blut der A. pulmonalis wird nach Oxygenierung in der Alveolarregion über die Lungenvenen, die in den intersegmentalen Bindegewebssepten verlaufen, dem linken Atrium des Herzens zugeführt. Die Lungenvenen markieren somit die Segmentgrenzen (s. Abbildung 1).

Die nächste Untereinheit stellen die Lobuli pulmonales dar, die je von einem Bronchiolus, der den Segmentbronchien entspringt, versorgt werden. Bronchioli sind definiert durch einen Durchmesser < 1 mm. Sie teilen sich zu Bronchioli terminales, aus denen jeweils zwei bis drei Bronchioli respiratorii hervorgehen. Ihr Epithel ist einschichtig, kubisch und meist nicht mit Kinozilien besetzt. Die weitere Aufteilung erfolgt in die Ductuli alveolares,

welche sich zu Sacculi alveolares öffnen, deren Wände letztendlich die Alveoli pulmonales bilden. Die Gesamtheit der Alveolen, die aus einem Bronchiolus terminalis entspringen, werden als die kleinste funktionelle respiratorische Einheit, der Acinus, zusammengefasst (46).

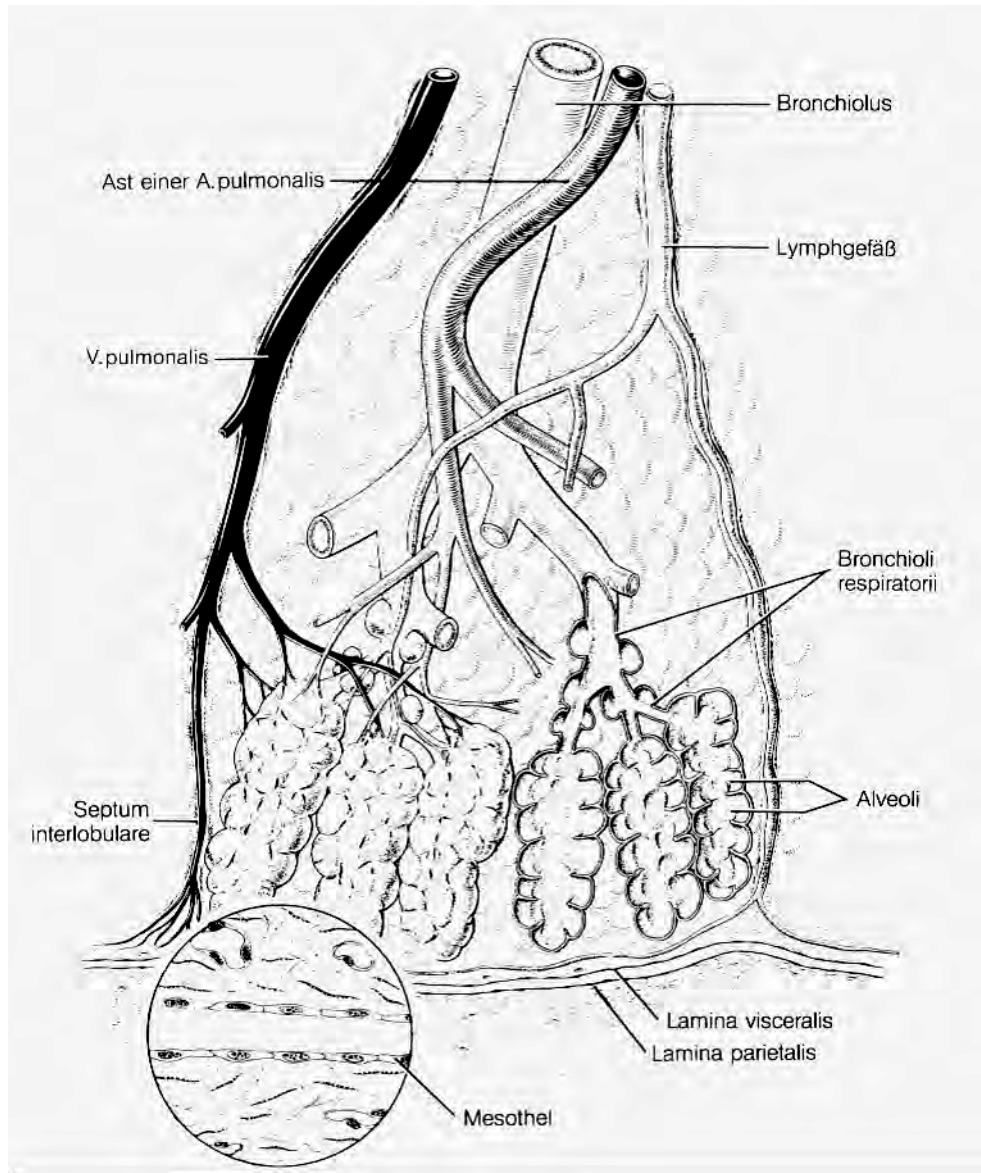


Abbildung 1: Blut- und Lymphgefäße der Lungenlappchen. Im Septum interlobulare sind Lymphgefäße (rechts) und Äste der V. pulmonalis (links) getrennt gezeichnet. Dagegen legen sich die Äste der A. pulmonalis dem Bronchialbaum an. Nach: *Junqueira LC, et al. 2002.*

Die Öffnungen der Sacculi alveolares und der Alveolen sind von glatten Muskelzellen und elastischen Fasern umgeben. Zwei benachbarte Alveolen werden durch das Septum interalveolare getrennt. In ihm befinden sich Kapillaren und Bindegewebe, sowie ein dichtes Netzwerk elastischer und

kollagener Fasern (Typ IV und V). Zusammen mit den glatten Muskelzellen ermöglicht dieses Fasernetzwerk die Retraktion der Alveolen nach Dehnung, d. h. die elastische sowie aktive Austreibung der Expirationsluft durch Kontraktion, und verhindert eine Überdehnung der Lungenbläschen. Zum Lumen der Alveolen hin wird das Septum von flachem Typ I Alveolarepithel bedeckt. Vereinzelt finden sich Typ II Alveolarepithelzellen, die Surfactant produzieren (46, 77)(s. Abbildung 2).

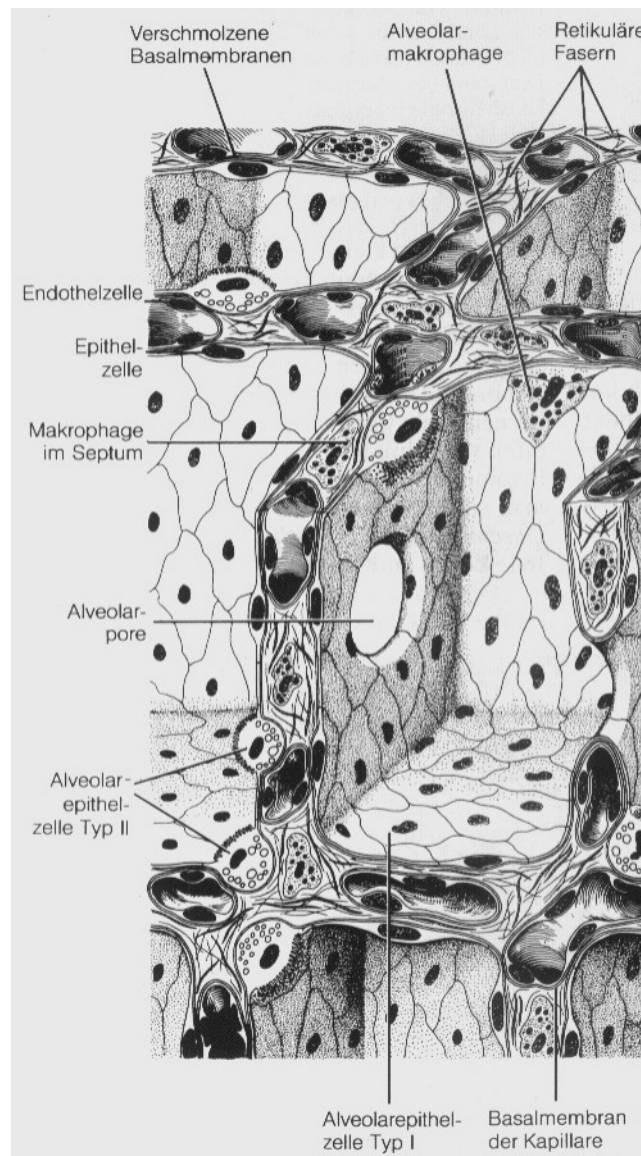


Abbildung 2: Dreidimensionales Schema von Lungenalveolen mit Inter-alveolarsepten.

Die Oberfläche der Alveolenwände wird von einem zusammenhängenden Alveolarepithel bedeckt (Typ I Alveolarepithelzellen). Ausserdem kommen Zellen mit Mikrovilli vor, die sich in das Lumen vorwölben (Typ II Alveolarepithelzellen). Nach: *Junqueira LC et al., 2002*

Das Gefäßsystem der Mäuselunge unterscheidet sich anatomisch von dem des Menschen. So sind die Lungenvenen der Maus mit quergestreifter Muskulatur versehen, was vermutlich die Austreibung des Blutes aus der Lunge begünstigt (9). Außerdem ist bei der Maus kein bronchiales Gefäßsystem, welches beim Menschen in Form der Vasa privata die nutritive Blutversorgung des Lungenparenchyms gewährleistet, angelegt.

1.1.2 Die allgemeine Embryonal- und Fetalentwicklung der Lunge

Die Entwicklung der Säugetierlunge lässt sich in die Embryonal- und Fetalperiode unterteilen. Die Fetalperiode wiederum besteht aus der pseudoglandulären, der kanalikulären, der sakkulären und der alveolären Periode.

Die Embryonal-Periode: Am Boden des Vorderdarmes senkt sich die Laryngotrachealrinne ein, die in ihren kaudalen Anteilen die Lungenanlage beinhaltet. Diese entodermale Anlage entwickelt sich zu der epithelialen Auskleidung der luftleitenden Atemwege, den Alveolen und dem Drüsengewebe. Bindegewebe, Muskulatur und Gefäße gehen aus dem umliegenden Mesoderm hervor (75). In der weiteren Entwicklung bilden sich aus der Lungenanlage die beiden Lungenknospen, aus denen die Hauptbronchien entstehen. Aus der Teilung der Knospen resultieren die Lappenknospen, die sich zu den Lappenbronchien differenzieren, und aus denen die Lungenlappen hervorgehen (80). Beim Menschen werden rechts drei und links zwei Lappenknospen angelegt, während bei der Maus rechts vier und links ein Segment entsteht. Durch weitere dichotome Teilungen der Lappenbronchien bilden sich Bronchopulmonalknospen, die sich mit dem umgebenden Mesenchym zu bronchopulmonalen Segmenten entwickeln. Zum Ende der Embryonalperiode sind alle Lappen- und Segmentbronchien inklusive ihrer definitiven Lungenarterien- und Lungenvenenanschlüsse angelegt (80).

Es schließen sich die vier Stadien der fetalen Lungenentwicklung an, in denen die Differenzierung des Lungengewebes vom Hilus zur Peripherie hin

fortschreitet. Die einzelnen Perioden laufen in der Lunge teilweise parallel ab und können daher u. U. auf demselben Schnitt beobachtet werden.

Die pseudoglanduläre Periode: (Maus: ab ca. Tag 13-16 nach Befruchtung (E13-16), Mensch: ca. 5.-17. Schwangerschaftswoche (SSW))

Die Lungenanlage gleicht in dieser Phase histologisch einer tubulo-azinösen Drüse. Die Bronchialsprossen sind von einer Mesenchymschicht umgeben, die deren weitere dichotome Teilung induziert. Bis zum Ende dieser Periode entstehen alle späteren luftleitenden Anteile des Bronchialtraktes bis hin zu den Bronchioli terminales. In die folgende Entwicklungsphase überleitend, sprossen tubuläre Epithelknospen von den Bronchioli terminales aus, die sich letztendlich zum gesamten gasaustauschenden Gewebe differenzieren werden (75).

Die kanalikuläre Periode: (Maus: ca. E15-17, Mensch: ca. 18.-26. SSW)

Es beginnt die Entwicklung des gasaustauschenden Parenchyms der Lunge. Bronchien und Bronchioli erweitern sich und die Vaskularisierung nimmt zu. Die im vorherigen Abschnitt erwähnten Aussprossungen wachsen unter dichotomen Teilungen in die Länge. Die aus den Bronchioli terminales hervorgegangenen Bronchioli respiratorii teilen sich in 2-3 Generationen und werden vom umgebenden zellreiche Mesenchym über die Gefäßversorgung zu einem Azinus zusammengeschlossen (80). Am Ende der Bronchioli respiratorii entstehen weitere 3-4 Generationen von Tubuli. An diese lagern sich Kapillaren an. Nach Abflachung des Epithels bilden sich terminale Sacculi. Voneinander getrennt durch Primärsepten, repräsentieren sie die ersten primitiven Strukturen des Gasaustausches.

Die sakkuläre Periode: (Maus: ca. E17 – Tag 4 nach Geburt, Mensch: ca. 25. SSW – Geburt)

Durch weitere dichotome Teilungen der Sacculi terminales entstehen neue Canaliculi mit endständigen, dünnwandigen Sacculi (s. Abbildung 3, P2). Es kommt zu einer massiven Vergrößerung des Lungenparenchyms. Durch Komprimierung des interstitiellen Gewebes nähert sich das Kapillarnetz den

Lufträumen an. Zum Geburtstermin ist die Aufzweigung der distalen Abschnitte der später Alveolen tragenden Luftwege abgeschlossen (75).

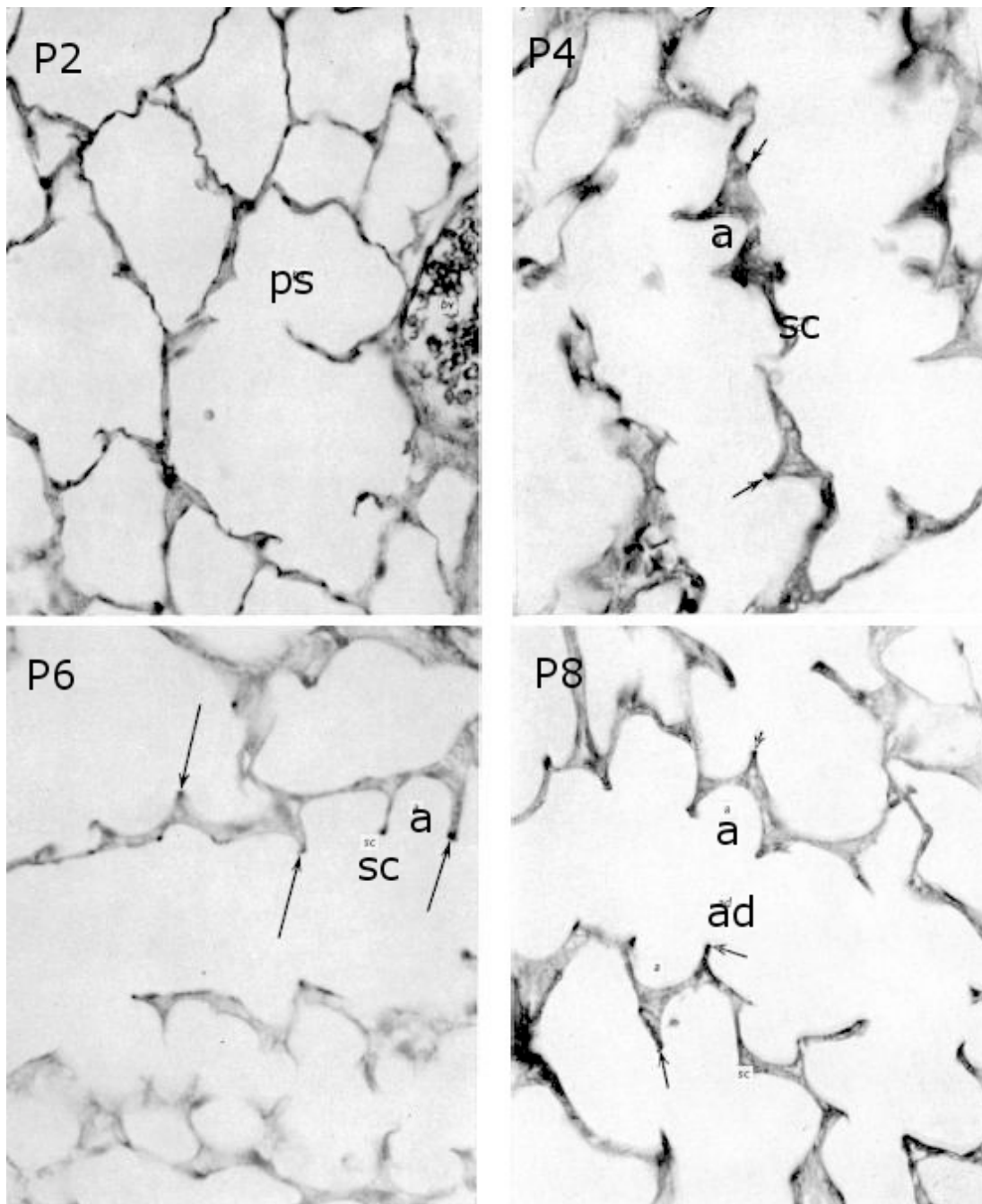


Abbildung 3: Histologische Darstellungen der Lungenentwicklung an den postnatalen Tagen zwei (P2), vier (P4), sechs (P6) und acht (P8). Zunächst zeigen sich simple primärer Sakkuli (ps) an P2. An P4 wachsen erste sekundäre Septen (sc) mit elastischen Fasern an ihren Spitzen (→) aus. Erste primitive Alveolen (a) entstehen. Diese verlängern sich an P6 und die Alveolen vertiefen sich. An P8 bestehen tiefe Alveolen (a) und Ductus alveolares (ad) werden erkennbar. Nach: Amy RWM, et al., 1977

Die alveoläre Periode: (Maus: postnatal ab Tag 4, Mensch: späte Gestation bis wahrscheinlich frühes Kindesalter)

Aus den dünnwandigen Canaliculi entwickeln sich die Ductus alveolares, und aus den terminalen Sacculi gehen die Sacculi alveolares hervor. Aus den Primärsepten wachsen Sekundärsepten aus, dies ist als Prozess der sekundären (oder eigentlichen) Alveolarisierung bekannt (s. Abbildung 3, P4-8). Das doppelschichtige Kapillarnetz der Septen wird mit zunehmender Reifung der Septen einschichtig. Die Alveolen werden von flachen Typ I Alveolarepithelzellen ausgekleidet, zwischen denen sich vereinzelt kubische Typ II Alveolarepithelzellen befinden. In den Septen entstehen aus dem Mesenchym elastische Fasern (s. Abbildung 3, P4-P8 →) und Muskelzellen. Die Alveolarisierung findet beim Menschen in den letzten Wochen der Gestation und postnatal, bei der Maus überwiegend postnatal statt.

1.1.3 Postnatale Lungenentwicklung

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass beim Menschen die meisten Alveolen in der Kindheit gebildet werden (26, 28). Es wird beschrieben, dass bei Geburt ca. 50 Millionen Alveoli angelegt sind. Daher müssen sich mehr als 80% der durchschnittlich 300 Millionen Alveolen der adulten Lunge postnatal entwickeln (20, 96). Über das Ende der Alveologenese herrscht in der Literatur Uneinigkeit (18, 58, 79, 86). *Thurlbeck et al.* postulierten, dass sich beim Menschen die Mehrheit der Alveolen im Alter von zwei Jahren entwickelt haben, die Alveolarisierung zu diesem Zeitpunkt also weitestgehend beendet ist (85). Nach aktueller Forschungslage gilt die Alveologenese im Alter von zwei bis drei Jahren als abgeschlossen; ältere Publikationen beschreiben eine Entwicklungsdauer von bis zu 16 - 20 Jahren (20, 79, 96).

Hinsichtlich der Dauer und des Ablaufes der postnatalen Alveolarisierung ist die Ratte das am besten untersuchte Tier (47). *Burri et al.* konnten durch Messung der Distanzabnahme zwischen Alveolarwänden zeigen, dass die postnatale Alveolarisierung in der Ratte an P7 zu ca. 70% abgeschlossen ist

(19, 58). Endgültig beendet wird die Alveologenese bei der Ratte und der Maus ungefähr an P40 - 50 (58). Zusammenfassend lässt sich die Lungenentwicklung der Ratte zeitlich in drei Phasen aufgliedern: 1) Bei Geburt besitzt die Lunge keine Alveolen. Die bestehenden primären Septen sind unreif und beinhalten eine doppelte Kapillarmembran. Von Tag 1 bis Tag 4 nach Geburt erfährt die Lunge ein Wachstum durch Expansion der Lufträume ohne nennenswerte Zellproliferation. 2) Es schließt sich von Tag 4 bis 13 eine Phase massiver Zellproliferation an (Gipfel ca. an P4). Es werden sekundäre Septen gebildet, die in die Länge wachsen und an Dicke abnehmen. Definitive Alveolen entstehen. 3) Die Phase erhöhter Proliferationsraten hält bis P21 an. Im Mittelpunkt dieser Phase steht die Differenzierung der sekundären Septen im Sinne eines strukturellen Rearrangements. Es stellt sich ein gleichmäßiges Wachstum („*phase of equilibrated growth*“) ein, das durch weitere Reifung der sekundären Septen charakterisiert ist. Die Alveolarwände werden durch Minderung der Zahl und des Volumens von interstitiellen Fibroblasten dünner und die Mikrovaskularisation reift aus: Es bildet sich eine einschichtige Kapillarmembran. Weiteres Wachstum der Alveolar-Oberfläche geschieht von nun an vor allem durch Dehnung und nicht durch Zellproliferation (17, 19, 47, 48).

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Alveologenese in peripheren Arealen der Mäuselunge früher bzw. ausgeprägter stattfindet als in zentralen. Subpleural beginnt die Alveolarisierung an P1. Bis P15 sind erhöhte Proliferationsraten nachweisbar. Zentral hingegen findet sich zwischen P4 und P9 eine Phase rapider Proliferation (38). Vergleichbare Geschehnisse mit einem anderen Zeitverlauf sind auch für die Ratte beschrieben (60).

Hinsichtlich der menschlichen Alveolarisierung und septalen Reifung lassen sich Parallelen zu den Entwicklungsphasen der Rattenlunge erkennen, wobei sich die zeitliche Abfolge unterscheidet (s. Abbildung 4): Die Anlage der sekundären Septen dominiert beim Menschen zwischen später Fetalperiode und den ersten 18 postnatalen Monaten. Daran schließt sich eine Phase der Reifung der Mikrovaskularisation an, die im Alter von zwei bis drei Jahren

abgeschlossen ist. Bis zum Finitum des Körperwachstums verlängern sich die reifen sekundären Septen weiterhin, was eine Vergrößerung der Gasaustauschfläche zur Folge hat („normal growth period“)(96, 97).

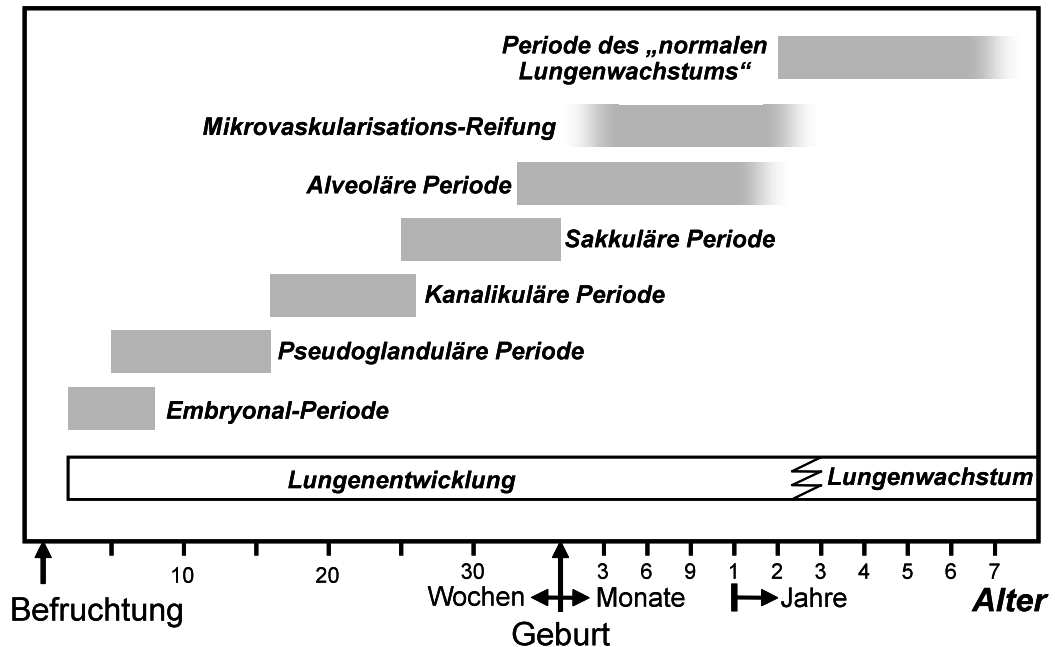


Abbildung 4: Fetale und postnatale Lungenentwicklung des Menschen. Phasen der Lungenentwicklung und des Lungenwachstums mit deren Zeitablauf. Fließende Balkenenden bei Alveolarisierung und Mikrovaskularisations-Reifung repräsentieren Unklarheit des jeweiligen Anfangs- und Endzeitpunktes. Aus: Zeltner B et al., 1967

Entgegen der vorherrschenden Meinung, konnte nachgewiesen werden, dass neue Alveolen bei Ratten auch von reifen Septen ausgehen können, und dies auch noch nach Abschluss der Lungenreifung (min. bis P60). Es konnte gezeigt werden, dass für die Anlage neuer Septen bei der Ratte nicht, wie bisher geglaubt, zwangsläufig das Vorhandensein einer doppelten Kapillarschicht nötig ist. Vielmehr kommt es an den Orten, wo sekundäre Septen aussprossen, u. a. zu einer lokalen Duplikatur des Kapillarnetzes. Somit kann die Alveolarisierung prinzipiell auch nach der Phase vaskulärer Reifung an Septen mit einschichtiger Kapillarmembran in fortgeschrittenen Lebensaltern stattfinden (79).

1.1.4 Die postnatale Entwicklung der murinen Lunge

Bei der Maus, findet die Septierung wahrscheinlich ausschließlich postnatal statt (3). Dies wird auf den geringen pränatalen Aktivitätsgrad bzw. die geringe Beweglichkeit des Feten zurückgeführt (58).

Zum Zeitpunkt der Geburt existieren in der Mäuselunge, wie auch bei der Ratte, keine durch sekundäre Septen entstandenen Alveolen. Prädominante Strukturen der terminalen Luftstrombahn sind die großen, glattwandigen primären Sacculi, die von Typ I Alveolarepithelzellen (AE1) ausgekleidet werden. Die Wände der Sacculi enthalten eine kapilläre Doppelmembran und interstitielle Zellmasse. In dieser finden sich u. a. Typ II Alveolarepithelzellen (AE2) und Zellen mit Lipidvakuolen (3, 47), auch Lipofibroblasten genannt. Lipofibroblasten sind an der Surfactant-Phospholipid-Synthese von AE2 beteiligt und stehen unter Verdacht, auch bei der Alveolarentwicklung mitzuwirken (81).

Im Verlauf der ersten drei postnatalen Tage vergrößern sich die primären Sacculi und an ihren Wänden entstehen lumenseitig flache Grate („secondary crests“). Diese Grate, bestehend aus von AE1 umgebenen interstitiellen Zellen, unterteilen die primären Sacculi in zwei oder mehr Anteile und repräsentieren Anlagen der sekundären Septen. An ihren Entstehungsorten reichern sich elastische und kollagene Faserbündel sowie basal und apikal die oben beschriebenen Lipofibroblasten an. Diese zeigen eine hohe Mitose-Aktivität und sind an der Surfactant-Synthese durch AE2 beteiligt (65). Weiter an der Spitze der neu entstehenden Septen befinden sich zudem Myofibroblasten, die an der Synthese und Sekretion von Elastin beteiligt sind (88). Myofibroblasten und elastische Faserbündel werden eng mit der Formierung sekundärer Septen in Verbindung gebracht, da dieser Prozess durch mechanischen Zug an den Fasern begünstigt werden könnte (1). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass *Platelet-derived growth factor* A-defiziente Mäuse (PDGF-A ^{-/-}), denen α -SMA und alveoläre Myofibroblasten fehlen, eine Blockade der sekundären Septierung zeigen (7, 27). In die entstehenden sekundären Septen stülpt sich eine Schicht des doppelten Kapillarnetzes ein und bildet dort weiterhin eine kapilläre Doppelschicht. An P3 und P4 wachsen die sekundären Septen schnell in die

Länge, was zur Bildung der ersten Alveolen mit unreifen Septen führt. Die interstitiellen Zellen zeigen vereinzelt mitotische Figuren. Diese Phase der rapiden Alveolarisierung dauert von P4 bis P14. Bis P22 halten Reifungsprozesse des Gewebes an. Das doppelte Kapillarnetz der sekundären Septen wird hierbei durch ein einfaches ersetzt („*microvascular Maturation*“), und die interstitiellen Zellen verlieren an Prominenz; die Lunge entwickelt ihren histologisch adulten Charakter (3).

Verschiedene Publikationen geben Einblick in die zelluläre Proliferationskinetik der murinen Lungenentwicklung. Die Phase der hohen globalen Proliferationsraten in der Mäuselunge erstreckt sich demnach von P3 bis P8. Direkt nach Geburt finden sich kaum Zellteilungen. An P3 kommt es zu einem massiven Anstieg der Mitosen mit 10-facher Erhöhung der Basalwerte auf ca. 10% an P4, dem Zeitpunkt der einsetzenden Alveolarisierung. Ab P8 sinken die Werte wieder und fallen bis zum Ende der Alveolarisierung an P14 auf den Ausgangswert zurück (25). Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen zum Verlauf des postnatalen Lungengewichtes: Die Lunge nimmt von Geburt bis P1 nicht an Gewicht zu, obgleich die Maus in besagter Zeit ca. 30% an Körpergewicht gewinnt. Das Lungenwachstum wird daher in dieser Zeit eher durch Expansion als durch zelluläre Proliferation bestimmt. Es zeigt sich daraufhin bis P10 eine starke Lungengewichts-Zunahme als Ausdruck der hohen Mitoseraten, die in der folgenden Zeit wieder rückläufig ist (3).

1.1.4.1 Die postnatale Proliferation der untersuchten Zelltypen

Wie bereits erwähnt, sind genaue Daten zu den Zelltyp-spezifischen Proliferationsraten im postnatalen Lungenwachstum lediglich für die Ratte genauer erforscht. Detektion der Mitoseraten erfolgte in allen zitierten Studien durch [³H]-Inkorporation in die DNA bzw. anti-phospho-H3(H3P) Immunfluoreszenz (IF) – Färbungen. H3P-IF diente der Darstellung von phosphorylierten Histonproteinen. Die Phosphorylierung von Histonproteinen erhöht die Zugänglichkeit der DNA und reguliert so die Transkription während Mitose und Meiose (37, 70).

In früheren Studien zeigten pulmonale Myofibroblasten an P1 einen Anteil proliferierender Zellen von 6,5%, welcher bis P4 auf 14% ansteigt. Dieser Anstieg lässt sich gut mit der Gewebsvermehrung bis P13 korrelieren, wonach die absolute Anzahl der Fibroblasten und deren Anteil am Lungengewebsvolumen wiederum abnehmen (17, 47). Die diesen Werten zugrunde liegende Studie unterschied nicht zwischen den beiden bereits beschriebenen Populationen von Fibroblasten, nämlich 1) Fibroblasten mit Lipidvakuolen am Boden der sekundären Septen, deren massive Proliferation an P7 mit dem Sprossen von alveolären Septen korreliert und 2) Myofibroblasten mit kontraktilen Eigenschaften in den Spitzen der Septen, die mit der Elastin-Deposition in Verbindung stehen (47, 88).

Alveolarepithel zeigt hingegen eine andere Kinetik: An P1 proliferieren weniger als 0,5% der Typ II Alveolarepithelzellen (AE2). Die Indizes steigen bis P4 auf 3% und gipfeln ab P7 bei 7%. Eine Abnahme der Raten ist erst nach P10 erkennbar. Während der ersten sieben postnatalen Tage bleibt die absolute Zahl der AE2 jedoch konstant. Zur gleichen Zeit zeigt die absolute Zahl der Typ I Alveolarepithelzellen (AE1) einen massiven Zuwachs, obgleich bei diesem Zelltyp keine Mitosen detektierbar sind. Diese Beobachtungen gelten als beweisend dafür, dass AE2 als Progenitorzellen für AE1 fungieren (2, 47).

Die Proliferationsraten der Fibroblasten und AE2 fallen nach P10 signifikant, an P21 ist lediglich bei AE2 noch eine leicht erhöhte Mitoseaktivität nachweisbar (47, 68).

In Bezug auf die Bronchialepithelien konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsraten schon ab P1 konstant erhöhte Werte aufweisen. Wie lange die Indizes dieses Niveau halten, ist nicht beschrieben (38).

1.2 Das kompensatorische Lungenwachstum

Seit 1892 ist bekannt, dass nach Lobektomie bzw. Pneumektomie (PNX) von Versuchstieren das verbleibende Lungengewebe ein kompensatorisches Wachstum aufweist (22). Die chirurgische Entfernung eines oder mehrerer Lungenlappen resultiert in einer Verminderung der Diffusionskapazität durch

Reduktion der Alveolenzahl sowie der zum Gasaustausch zur Verfügung stehenden vaskulären Strukturen. Um einen adäquaten Gasaustausch aufrecht zu erhalten, wird im Versuchstier nach Resektion die Diffusionskapazität der verbleibenden Lungenlappen erhöht und neues gasaustauschendes Gewebe generiert (15).

Beschrieben wurde das kompensatorische Lungenwachstum bereits für Hunde (41, 42, 72, 84, 87, 94), Frettchen (62, 64), Schweine (49), Ratten (10, 11, 50), Kaninchen (21) und Mäuse (14, 66, 76, 90). In Nagetieren kommt es nach PNX zu einer vorübergehenden Hochregulierung verschiedener Transkriptions-Faktoren (52), gefolgt von der Zunahme des Lungengewichtes, assoziiert mit proportionaler Vermehrung der Zellpopulationen der Alveolarsepten, der Protein- und DNA-Menge sowie einer Kollagen- und Elastin-Akkumulation (1). Dies führt zur Normalisierung der Lungenmasse und Alveolarstruktur, vergleichbar mit der eines nicht pneumektomierten Kontrolltieres (15, 35). Auch für den Menschen wird ein geringes regeneratives Lungenwachstum, z.B. nach Lobektomie in der Kindheit, bis zum Alter von etwa 4 Jahren diskutiert (53, 67). Die genauen Induktions- und Regulations-Mechanismen dieses Wachstums sind bis in die heutige Zeit weitgehend unverstanden (43).

1.2.1 Charakteristika des kompensatorischen Lungenwachstums in der Maus

Die rechte Lunge linksseitig pneumektomierter Mäuse zeigt eine rapide Volumenzunahme über 21 Tage nach PNX (21d pPNX), die bereits 1d pPNX erkennbar ist. Nach 21 Tagen ist ein Lungenvolumen erreicht, das dem gesamten Volumen nicht pneumektomierter Kontrolltiere gleicht. Auch der DNA-Gehalt der rechten Lunge entspricht dann dem Gesamtgehalt der rechten und linken Lunge von Kontrolltieren. Dies impliziert, dass die Volumenzunahme tatsächlich auf dem Wachstum von Alveolarwänden und der Bildung neuer Alveolen beruht. In stereologischen Untersuchungen lassen sich bis auf eine subpleurale Dickenzunahme der Alveolarsepten keine Unterschiede zwischen dem Lungengewebe von pneumektomierten

und nicht pneumektomierten Mäusen erkennen. In der Bodyplethysmographie sind 3d pPNX die Atemfrequenz erhöht und das Tidalvolumen erniedrigt. Im weiteren Verlauf gleichen sich die Werte bis Tag 21 den Werten der Kontrolltiere an (12, 66, 90).

1.2.2 Proliferationskinetik im kompensatorischen Lungenwachstum

Untersuchungen der zellulären Proliferation in Mäuselungen nach PNX konnten zeigen, dass innerhalb der ersten 10 postoperativen Tage die Mitoseraten in den Alveolarsepten signifikant ansteigen. Dabei wurde beobachtet, dass in subpleuralen Arealen der verbleibenden Lunge tendenziell höhere Proliferationsraten vorliegen als in zentralen. Sechs - sieben Tage pPNX wurde eine vermehrte Proliferation von Typ I & II Alveolarepithelzellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen sowie Fibroblasten beschrieben. Somit beteiligen sich alle maßgeblichen Zelltypen der Lunge am kompensatorischen Wachstum (12, 15, 31, 66, 90).

Über den genauen Zeitablauf der Proliferation verschiedener Zelltypen während des kompensatorischen Lungenwachstums in der Maus ist bisher nichts bekannt.

Bei Ratten wurde der zeitliche Anstieg globaler Proliferationsraten nach unilateraler PNX mittels [³H]-Thymidin-Inkorporation bestimmt. Es zeigte sich eine Zunahme der Proliferation bereits an Tag 1 pPNX. Die Zahl der radioaktiv markierten Zellkerne steigt global in den ersten drei postoperativen Tagen steil an (s. Abbildung 5-A) (10) und es wird an Tag 6 pPNX ein Gipfel der DNA-Synthese erreicht. In subpleuralen Alveolen wird der *Peak* bereits am vierten postoperativen Tag erreicht, in zentralen Regionen erst an Tag 6. (12). Außerdem wird postuliert, dass sich die Proliferation in den verdickten subpleuralen Alveolarsepten durch eine besondere Intensität auszeichnet (31). Das Ende der Periode erhöhter Zellteilungen wurde bislang nicht bestimmt.

An die erste Phase des kompensatorischen Lungenwachstums im Sinne einer Vermehrung der Zellmasse schließt sich eine Periode der Zunahme

des Lungengewichtes und -volumens an, die 2 Wochen postoperativ abgeschlossen ist (s. Abbildung 5-B/C).

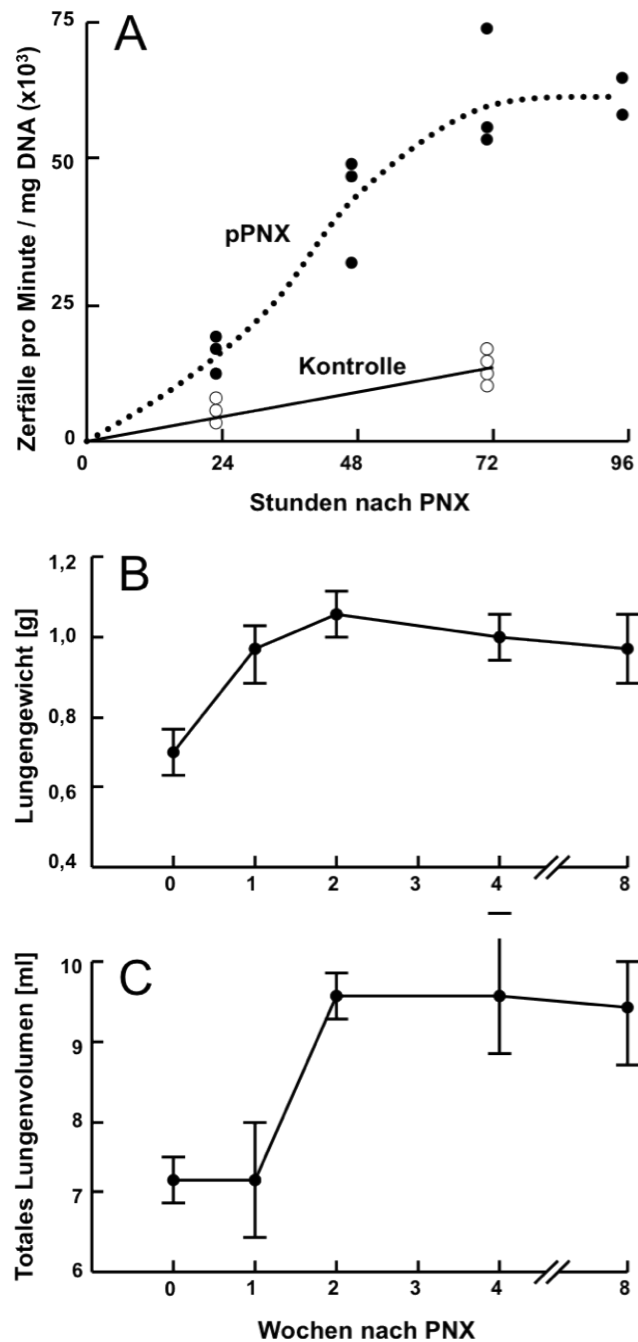


Abbildung 5: Proliferationsraten, Lungengewicht und -volumen nach PNx in der Ratte.

A) Proliferationsraten gemessen durch [^3H]-Thymidin-Einbau in die DNA in acht-stündigen Abständen. Radioaktivität der Isotopen-markierten DNA wurde gemessen in Zerfällen pro Minute pro Milligramm DNA. Aufgetragene Werte repräsentieren 2-4 Lappen der rechten Lunge pPNx zum jeweiligen Zeitpunkt. B) Veränderungen des Lungengewichts gemessen in Gramm und C) des Lungenvolumens gemessen in Millilitern postoperativ. Zeitpunkt 0 repräsentiert Kontrolltiere. Werte aufgetragen als MW \pm 2 SEM. Aus: Brody JS 1975

1.2.3 Modulatoren des kompensatorischen Lungenwachstums

In den nächsten Kapiteln werden exemplarisch einige bisher in der Literatur postulierte Regulations-Mechanismen und beeinflussende Faktoren des kompensatorischen Lungenwachstums erläutert.

1.2.3.1 Altersspezifische Unterschiede

Verschiedene Studien haben sich mit der Frage auseinandergesetzt, ob sich das Ausmaß des kompensatorischen Lungenwachstums mit dem Alter der Versuchstiere verändert. Nicht ausgewachsene Tiere besitzen generell ein höheres Wachstumspotential als adulte Tiere.

So zeigte sich beispielsweise, dass der Verlust von >50% des Lungengewebes bei unausgewachsenen Hundewelpen in massivem kompensatorischen Lungenwachstum mit vollständiger Regeneration des pulmonalen alveolo-kapillären Netzwerkes resultiert. Das generierte Gewebe bleibt zeitlich über die Vollendung der somatischen Reife bestehen. Dahingegen wird bei adulten Hunden ein suffizienter Gasaustausch durch Utilisierung physiologischer Reserven und durch das Remodelling der verbleibenden Alveolarstrukturen erreicht (84, 87).

Ähnliche Untersuchungen wurden auch an Kaninchen durchgeführt. Die Kaninchenlunge zeigt vollständiges kompensatorisches Lungenwachstum nach PNX im Alter von 10 und 18 Wochen. Im Alter von 26 Wochen führt die OP jedoch zu keiner vollständigen Anpassung der Alveolenzahl mehr, verglichen mit gleichaltrigen, nicht pneumektomierten Tieren. Vielmehr kommt es zu einer Vergrößerung der bestehenden Atemwege (21, 47).

Für die Ratte konnte eine Altersabhängigkeit nicht klar nachgewiesen werden. Generell ließ sich allerdings zeigen, dass - unabhängig vom Ausmaß des kompensatorischen Wachstums - das postoperative Intervall bis zur Wiederherstellung des resezierten Lungengewebes bei jungen Tieren wesentlich kürzer ist als bei adulten (15, 24). In anderen Studien wurde nach PNX im Alter von 4 oder 8 Wochen von einer größeren Zunahme des

Lungenvolumens, -gewichtes, der Alveolaroberfläche und der Proteinbiosynthese als im Alter von 12 Wochen berichtet (39).

Für den Menschen wird angenommen, dass PNX bzw. Lobektomie in der Kindheit zu kompensatorischem Lungenwachstum führen. Bei Kindern, die im Alter von <5 Jahren operiert wurden, zeigt sich eine Lungenfunktion, die nur geringfügig gegenüber der erwarteten Funktion für beide Lungen vermindert ist. Dies deutet auf eine Hyperplasie als wichtigen Adaptations-Mechanismus hin. Bei älteren Menschen kommt es dagegen durch Hypertrophie und Überblähung der bereits existierenden Alveolen zur Ausdünnung der Diffusionswände (53, 67).

1.2.3.2 Mechanische Dehnung und erhöhter Blutfluss

Durch die Entfernung von Lungengewebe kommt es postoperativ zu Veränderungen der intrapleural wirkenden Kräfte. Durch das vermehrte Platzangebot verlagert sich das Mediastinum zur resezierten Lungenseite hin. Der Zug des Diaphragmas und der Thoraxwand führen zu erniedrigten intrapleuralen Drücken. Des Weiteren wird das gesamte Herzzeitvolumen nach Resektion von ca. 50% des Lungengewebes durch die verkleinerte Lunge geleitet, was in einer lokalen Verdoppelung der pulmonalen Perfusion resultiert (64). Dadurch erhöhen sich die mechanischen Zug-, Dehnungs- und Scherkräfte, die auf das verbleibende Lungengewebe einwirken. Jedoch genügen dafür auch subtilere Einflüsse wie etwa das Kollabieren und die daraus resultierende Atelektase eines Lungenlappens im Rahmen einer Thorakotomie (31). Die o. g. auf das Gewebe wirkenden Kräfte gelten in diversen Veröffentlichungen als dominantes Signal für die Initialisierung und Vollendung des kompensatorischen Lungenwachstums *in vivo* (1, 22, 43, 54, 71). Es konnte gezeigt werden, dass es in der Ratte bis zur Wiederherstellung der physiologischen intrapleuralen Druckverhältnisse zu anhaltendem Lungenwachstum kommt (24). Weiterhin bestärkt wird die These durch Versuche, den freigewordenen Hemithorax mit intrathorakalen Platzhaltern aus inerten Materialien auszufüllen (z.B. Wachsplomben oder Schwämme), denn es konnte sowohl für Hunde (41, 94) als auch für Ratten

(31), Mäuse (12), Frettchen (63) und Kaninchen (69) nachgewiesen werden, dass das fehlende Dehnungssignal das kompensatorische Lungenwachstum vermindert. Es wird dabei besonders die starke Proliferation in subpleuralen Arealen der Lunge abgeschwächt und verzögert. Werden die Platzhalter im Nachhinein entfernt, so wird das Wachstum der Lunge auch dann noch initiiert (41, 63, 94). Es wurde jedoch von *Wu et al.* gezeigt, dass in Hunden nach rechtsseitiger PNX trotz Verhinderung der Mediastinalverlagerung durch eine dreidimensionale Silikonprothese die linke Lunge eine Expansion von ca. 20% aufweist. Anstatt das Mediastinum zu verlagern, dehnte sich die Lunge nach kaudal aus und verdrängte das linke Hemidiaphragma. Daher sind Zugkräfte zwar ein wichtiges, aber nicht das einzige Signal zur Induktion des kompensatorischen Lungenwachstums (94).

Die fetale Lungenentwicklung scheint diesbezüglich Parallelen aufzuweisen. So ist der Dehnungsreiz durch fetale Atemexkursion ein essentieller Stimulus für die Proliferations-Induktion *in utero*, der auch an isolierten adulten Lungenzellkulturen *in vitro* bestätigt wurde (23, 55). Auch postnatal führt erhöhte Dehnung, z. B. durch Beatmung mit kontinuierlich positiven Beatmungsdrücken (CPAP), zu Lungenwachstum in Versuchstieren (98).

Als zusätzliche Induktoren des Lungenwachstums gelten vermehrte Atemarbeit der Atemmuskulatur, endotheliale Scherkräfte und kapilläre Dehnung. Wie oben bereits erwähnt, verdoppelt sich die pulmonale Perfusion nach Entfernung von ca. 50% des Lungengewebes lokal. Wie Studien gezeigt haben, beschleunigt die einseitige Ligatur der Pulmonalarterie bei neugeborenen Schweinen die kontralaterale Alveolarisierung (36). Eine Restriktion der pulmonalen Perfusion durch *Banding* einer lobären Pulmonalarterie der verbleibenden Lunge nach PNX hatte bei Frettchen keinen zusätzlichen Effekt auf den jeweiligen Anstieg des DNA-Gehalts von *gebandetem* und nicht *gebandetem* Lungenlappen (64). Somit ist der pulmonale Blutfluss kein kritischer Stimulus für das kompensatorische Lungenwachstum.

1.3 Ziele der Arbeit

In der vorgelegten Arbeit sollen neue Grundlagen für die Erforschung der Induktions- und Regulationsmechanismen des postnatalen Lungenwachstums und der kompensatorischen Alveolarisierung nach Pneumektomie in der C57Bl6/J Maus geschaffen werden.

Die in der bisherigen Literatur veröffentlichten Ergebnisse bezüglich zellulärer Wachstumsvorgänge in der Lunge sollen durch die quantitative Untersuchung der globalen und Zelltyp-spezifischen Proliferationskinetik nach Geburt sowie nach partieller Pneumektomie ergänzt werden.

Nach adäquater Fixation der postnatalen und post-Pneumektomie Lungengewebe werden auf Paraffin-Schnitten Immunfluoreszenz-Färbungen angefertigt. Es soll ein standardisiertes Färbeprotokoll etabliert werden, dass die Kombination eines Proliferationsmarkers mit jeweils einem Zelltyp-spezifischen Antikörper zur Detektion von Typ II Alveolarepithelzellen, alveolären Myofibroblasten und Bronchialepithelzellen ermöglicht.

Für die o. g. Lungenwachstumsmodi werden mittels Mikroskop-gestützter Quantifizierung und statistischer Auswertung jeweils

- 1) globale Proliferationsraten
- 2) Zelltyp-spezifische Proliferationsraten

erhoben. Des Weiteren soll untersucht werden, ob sich die These einer präferentiellen Alveolarisierung in subpleuralen Regionen der Lunge bestätigen lässt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Experimentelle Agenzien und Utensilien

- Bovines Serum Albumin (*PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich*)
- EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat, $\geq 99\%$, per analysis (p.a.), (*Carl Roth CoKG, Karlsruhe, Deutschland*)
- Eppendorf Reaktionsgefäße, 2ml (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)
- Ethanol [$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$], absolut (*Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*)
- Falcon-Röhrchen 15ml, 50ml (*Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland*)
- Glycerin, 87% (*Merck KGaA*)
- Hoechst 33342 Immunfluoreszenz-Kernfarbstoff, Trihydrochlorid, Trihydrat (*Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA*)
- Kaliumchlorid [KCl] (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA*)
- Kaliumdihydrogenphosphat [KH_2PO_4] (*Carl Roth CoKG*)
- Methanol [CH_4O] (*Carl Roth CoKG*)
- Mowiol Typ 4-88 (*CN Bioscience, La Jolla, CA, USA*)
- Natriumchlorid [NaCl] (*Carl Roth CoKG*)
- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat [$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] (*Carl Roth CoKG*)
- Paraformaldehyd (*Carl Roth CoKG*)
- Roti-Histol (*Carl Roth CoKG*)
- Salzsäure, rauchend (Rotipuran, 37%) p.a. [HCl aq.] (*Carl Roth CoKG*)
- TRIS-Puffer (Pufferan, $\geq 99,9\%$) p.a. [$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$] (*Carl Roth CoKG*)
- Triton X-100 [$\text{C}_{33}\text{H}_{60}\text{O}_{10}$] (*Carl Roth CoKG*)
- Wasser, doppelt destilliert (ddH_2O) aus *Milli-Q Water Purification System* (*Millipore Corp., Billerica, MA, USA*)
- Wasserstoffperoxid [H_2O_2] (Perthydrol), 30% (*Merck KGaA*)

2.1.2 Immunfluoreszenz-Antikörper

- Alexa Fluor 488 markierte Goat Anti-Mouse IgG Sekundär-Antikörper (*Molecular Probes Inc.*)
- Alexa Fluor 555 markierte Goat Anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper (*Molecular Probes Inc.*)
- *Bandeiraea simplicifolia* Lectin-Antikörper, TRITC-labelled (*Sigma-Aldrich*)
- Monoklonaler Mouse Anti-IgG1 κ Isotype Control-Antikörper, Clone MOPC-31C, purified (*Becton Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA*)
- Monoklonaler Mouse Anti- α -Smooth Muscle Actin-Antikörper, Clone 1A4, Cy3-labelled (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA*)
- Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-Antikörper, purified, Clone 24 (*Becton Dickinson Bioscience*)
- Polyklonaler Rabbit Anti-Cow Cytokeratin-Antikörper (*DakoCytomation Inc., Carpinteria, CA, USA*)
- Polyklonaler Rabbit Anti-Human Prosurfactant Protein C (proSP-C)-Antikörper (*Millipore Corporation*)
- Polyklonaler Rabbit Anti-Mouse Adipocyte Differentiation-Related Protein (ADFP)-Antikörper (*Abcam, Cambridge, UK*)

2.1.3 Histologie-Bedarf

- Adhäsions-Objektträger SuperFrostPlus (25x75x1,0 mm) (*Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland*)
- Deckgläser #1 (*Menzel-Gläser*)
- Einbettkassetten Rotilabo® (*Carl Roth CoKG*)
- Super PAP Pen (*Zymed Laboratories, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA*)

2.1.4 Operations- und Präparationsmaterialien, Pharmaka

- Bepanthen® Augensalbe (*Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland*)
- Einwegkanülen Sterican®, 27G, 20G (*B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland*)

- Einwegskalpelle Nr. 11 + 20 (*Feather Safety Razor Co., LTD. Medical Division, Japan*)
- Einwegspritzen 10 ml, 20 ml, 50 ml (*B. Braun Melsungen AG*)
- Handschuhe, steril Gammex® (*Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien*)
- Hautantiseptikum Braunoderm® (*B. Braun Melsungen AG*)
- Heparin-Natrium 25.000 IE, 5 ml (*Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland*)
- Isofluran Forene® (*Abbott AG, Baar, Schweiz*)
- Maus C57Bl6/J, ♀, ♂ (*Jackson Laboratories, vertrieben durch Charles River Laboratories Germany, Sulzfeld, Deutschland*)
- Mikro-Pinzetten Moria MC31 und 32 (*Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland*)
- Mikroschere ToughCut® Spring Scissors (*Fine Science Tools GmbH*)
- Nadelhalter Castroviejo (*Fine Science Tools GmbH*)
- Nahtmaterial, 5/0 Tevdek® II, PFTE-beschichtetes Polyester (*Genenzyme Surgical Products Corp., USA*)
- Nahtmaterial, 6/0 Seide, DSM 11 (*Resorba, Nürnberg, Deutschland*)
- Natriumchlorid-Lösung, 0,9% (NaCl) (*DeltaSelect GmbH, Pfullingen, Deutschland*)
- Pulmonalkanülen-Spitze (*Hugo Sachs Elektronik-Havard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland*)
- Rimadyl®, Carprofen 50 mg / ml (*Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland*)
- Schere ToughCut® Iris (*Fine Science Tools GmbH*)
- Schleimhautantiseptikum Betaisodona® (*Mundipharma GmbH, Limburg / Lahn, Deutschland*)
- Venenverweilkanüle Vasocan®, 20G (*B. Braun Melsungen AG*)

2.1.5 Groß-Geräte

- Beatmungsgerät MiniVent Typ 845 (*Hugo Sachs Elektronik-Havard Apparatus GmbH*)
- Einbettautomat Leica ASP200S (*Leica Microsysteme Vertriebs-GmbH, Wetzlar, Deutschland*)
- Einbett-Center Leica EG1150 (*Leica Microsysteme Vertriebs-GmbH*)

-
- Enfluranverdampfer (umgebaut für Isofluran), Typ Enflurane Vapor 19.1 (*Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland*)
 - Feinwaage Typ EK-610i (*A&D Instruments Ltd., Tokio, Japan*)
 - Fluoreszenzmikroskop Zeiss Imager Z1 Axio (*Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland*)
 - Infrarot-Leuchte, Typ IR 11 (*Petra-electric, Burgau, Deutschland*)
 - Kaltlichtlampe, Typ KL 200 (*Schott AG, Mainz, Deutschland*)
 - Konfokales Laserscanmikroskop, invers Leica (*Leica Microsysteme Vertriebs-GmbH*)
 - Mikrotom, rotierendes, Typ HM 355s (*Microm International, Walldorf, Deutschland*)
 - Stereo-Labor-Mikroskop, Typ SLM1, Kaltlicht (*Karl Kaps GmbH, Asslar, Deutschland*)
 - Pipetten, Typ Transferpette 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000µl (*Brand GmbH, Wertheim, Deutschland*)
 - Thermomixer, Typ MR Hei-Standard (*Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland*)
 - Vortexgerät, Typ Vortexgenius VG3 (*IKA Werke GmbH, Staufen, Deutschland*)
 - Wärmeunterlage, Typ ThermoLux®, 6W (*Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland*)
 - Zentrifuge, Typ Heraeus Multifuge® 35-R (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA*)
 - Wärmeplatte für die Histologie, Typ HI 1220 (*Leica Microsysteme Vertriebs-GmbH*)
 - Wasserstreckbad für die Histologie, Typ SB 80 (*Microm International*)
 - Kühlplatte, Typ EG 1150C (*Leica Microsysteme Vertriebs-GmbH*)

2.1.6 Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS = Phosphate-buffered Saline)

10x-Konzentrat:

| | |
|--------|--|
| 80 g | NaCl |
| 2 g | KCl |
| 11,5 g | Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O |
| 2 g | Kaliumdihydrogenphosphat in |
| 900 ml | ddH ₂ O |

- pH auf 7,4 einstellen (mittels NaOH bzw. HCl)
- ddH₂O ad 1 l

Histo-Puffer:

| | |
|--------|-----------------------------|
| 3 g | Bovines Serum Albumin (BSA) |
| 70 ml | 1x - PBS |
| 200 µl | Triton X-100 |

- PBS ad 100 ml
- Lagerung bei -20°C lagern

BSA-Lösung 10%:

| | |
|-------|----------|
| 10 g | BSA |
| 70 ml | 1x - PBS |

- PBS ad 100 ml
- Lagerung bei -20°C

Paraformaldehyd (PFA)-Lösung 1%:

| | |
|-------------|-----------------|
| 10 g | PFA |
| 900 ml | 1x - PBS |
| 60°C, ~ 4 h | bis Ansatz klar |

- pH auf 7,4 einstellen (mittels NaOH bzw. HCl)
- PBS ad 1 l
- Lagerung bei -20°C

Mowiol - Eindeckmedium:

6 g \cong 4,9 ml Glycerol

2,4 g Mowiol Type 4-88

6 ml ddH₂O

~ 20°C, 2 h rühren

12 ml TRIS-HCl 200mM

60°C, ~ 20' rühren

4°C, 15' mit 4400 rpm zentrifugieren

- Lagerung bei -20°C

2.2 Methoden

2.2.1 Postnatales Lungenwachstum

Es wurden zehn Gruppen zu je fünf Mäusen mit zufälliger Geschlechterverteilung gebildet, deren Lungen zur Charakterisierung der Proliferationskinetik verschiedener Zelltypen dienten. An den Tagen P1 bis P10 wurden jeweils die fünf Lungen einer Gruppe entnommen und in diesen nach Gewebeaufbereitung und -fixierung mittels immunhistochemischer Färbungen die Teilungsraten von Bronchialepithel, Myofibroblasten und Typ II Alveolarepithelzellen sowie die globalen Proliferationsraten ermittelt. Es wurden jeweils die Mitoseraten in den zentralen sowie den subpleuralen Regionen untersucht und die Ergebnisse wurden mit der Proliferationskinetik beim kompensatorischen Lungenwachstum verglichen. Dabei wurden Parenchymregionen, die sich in direkter Nähe eines Hilus bzw. der Hauptbronchien befanden, als zentral bezeichnet. Parenchymbereiche, die direkt an die Pleura viszeralis grenzten, wurden als subpleural definiert. Bezüglich des Bronchialepithels galten die Hauptbronchien als zentral. In subpleuralen Regionen wurden kleine Bronchien bzw. Bronchioli terminales, die möglichst im Gesichtsfeld in Ductus alveolares übergingen, untersucht. Das Vorhandensein von Lipofibroblasten wurde qualitativ untersucht.

2.2.2 Kompensatorisches Lungenwachstum

Zur Induktion des kompensatorischen Lungenwachstums wurden acht Gruppen zu jeweils fünf C57Bl6/J Mäusen zufällig verteilter Geschlechter im Alter von acht Wochen einer unilateralen Pneumektomie unterzogen. An den Tagen 2, 4, 6 und 8 nach Pneumektomie wurden die verbliebenen Lungenanteile entnommen, fixiert und ebenfalls auf die in 2.2.1 beschriebenen Proliferationsraten hin untersucht sowie mit den Lungen einer Kontrollgruppe acht Wochen alter, nicht pneumektomierter (sham-operierter) Mäuse verglichen. Des Weiteren wurde die induzierte post-Pneumektomie-Alveolarisierung dem postnatalen Lungenwachstum gegenübergestellt.

2.2.3 Aufbau des Arbeitsplatzes für die Pneumektomie

Im Zentrum des Arbeitsplatzes für die Pneumektomie stand das Operations-Stereomikroskop an dem unter Sichtkontrolle und sterilen Bedingungen die Intubation und Operation durchgeführt wurden. Hinter dem Mikroskop befand sich das Gasnarkosesystem, das per gasdichter Schlauchverbindung mit einer dezentral platzierten Sauerstoffflasche verbunden war. Jeweils in Armreichweite befanden sich das Flowmeter, der Isofluranverdampfer, der Drei-Wege-Hahn zum Umschalten zwischen der Versorgung des gasdichten Behälters bzw. des Beatmungsgerätes mit Narkosegas, sowie der Vakuumbehälter, der der initialen Inhalationsnarkose der Mäuse diente. Unter dem Mikroskop befand sich eine Wärmeunterlage, die eine intraoperative Hypothermie der Mäuse verhinderte. Direkt dahinter waren das Beatmungsgerät und die Kaltlichtquelle aufgebaut. Am Arbeitsplatz befanden sich sterile Unterlagen, auf denen das autoklavierte Operationsbesteck, bestehend aus zwei Einwegskalpellen mit den Klingen Nr. 11 und Nr. 20, zwei breiten Pinzetten zur Intubation, zwei feinen Pinzetten für die Lungenresektion, dem Nadelhalter, dem Nahtmaterial und den Tubi gerichtet werden konnten.

2.2.4 Aufbau des Narkose-Systems

Das Narkose-System bestand aus einer Sauerstoffflasche (O_2 verdichtet, medizinisch) mit Druckminderer, einem Flowmeter zur Limitierung des Volumenflusses auf 1,5l/Min und einem Isofluranverdampfer (s. Abbildung 6). Vom Verdampfer konnte das Narkosegas mittels Drei-Wege-Hahn entweder in den Vakuumbehälter oder zum Beatmungsgerät geleitet werden. Vor dem Beatmungsgerät war ein Überfluss-Ventil eingebaut, dass die Ableitung überschüssigen Gases ermöglichte. Sämtliches Narkosegas sowie die Expirationsluft der Maus wurden kontinuierlich abgesaugt.

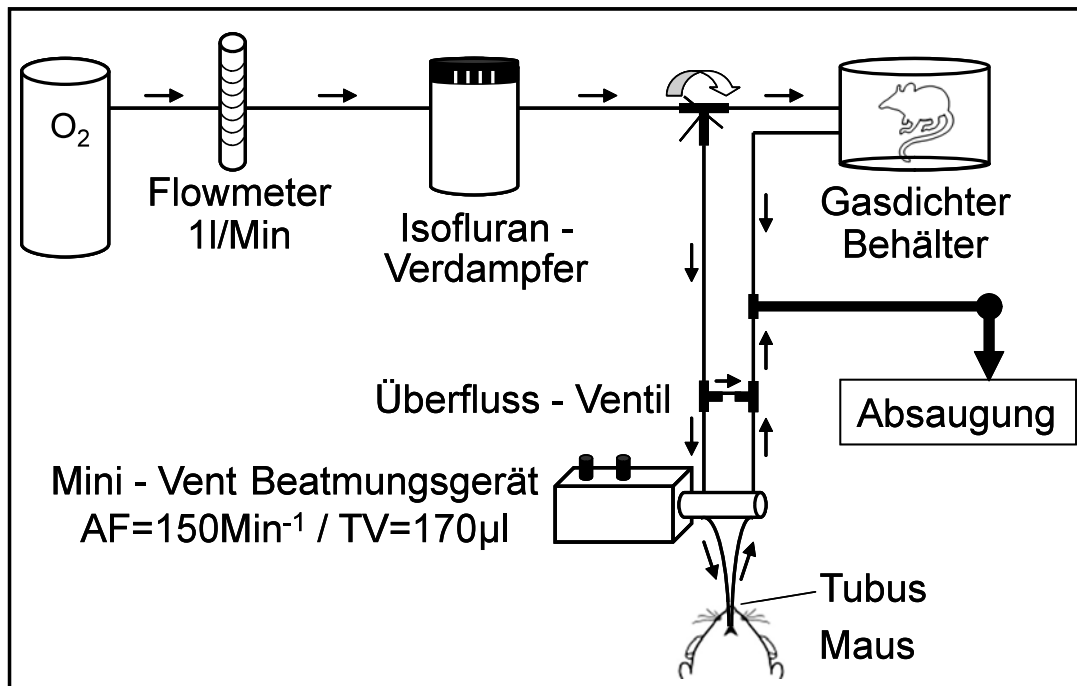


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Narkose-Systems. AF = Atemfrequenz, TV = Tidalvolumen, \rightarrow = Richtung des Gasflusses, \cup = Drei-Wege-Hahn.

2.2.5 Durchführung der Pneumektomie

Für die Anästhesie der Versuchstiere während der Pneumektomie wurde eine Isofluran-Inhalationsnarkose eingesetzt. Zur Durchführung der Thorakotomie war die Intubation und mechanische Beatmung der Maus notwendig. So konnte das perioperative Kollabieren der Lunge durch den entstehenden Pneumothorax verhindert und eine adäquate Oxygenierung der Maus gesichert werden.

Die Mäuse wurden zunächst in einem gasdichten Behälter, der mit 1,5 l/min 100% O_2 belüftet wurde, für eine Minute präoxygeniert. Anschließend wurden dem Sauerstoff über den Isofluran-Verdampfer 5 Volumen-Prozent Isofluran hinzugefügt. Die Tiere verblieben vom Einsetzen bis zur Vertiefung der Initial-Narkose bei kontinuierlicher Versorgung mit Narkotikum ca. fünf Minuten im gasdichten Behälter. Anschließend wurde das Narkosegas über den Drei-Wege-Hahn in das Beatmungsgerät umgeleitet. Danach wurde die Maus aus dem Behälter entnommen und zur Intubation mit den oberen Schneidezähnen an einen horizontalen Draht gehängt, so dass die

Einstellung des Kehlkopfes unter mikroskopischer Sichtkontrolle durchgeführt werden konnte. Zusätzlich zu der im Mikroskop integrierten Kaltlichtquelle, die von kranial den Rachenraum ausleuchtete, diente eine weitere Kaltlichtquelle der Beleuchtung der Larynxregion von ventral. So war es möglich nach oraler Einführung einer Pinzette und Verdrängung des Zungengrundes nach ventral bei geöffneter Epiglottis die Glottis zu identifizieren. Als Tubus diente der Venenverweilkatheter einer Vasocan® Braunüle (20G), der mithilfe einer weiteren Pinzette atraumatisch und unter Sichtkontrolle in die Trachea eingeführt wurde. Das Versuchstier konnte daraufhin an das Beatmungsgerät angeschlossen und in Rechtsseitenlage auf der mit Tüchern bedeckten Wärmematte fixiert werden (s. Abbildung 7-A). Die Beatmung erfolgte mit einem Tidalvolumen von 150-200µl bei einer Atemfrequenz von 150 Min⁻¹. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erhielt das Tier während der gesamten Operation 100% O₂ + 1,5 Vol.% Isofluran. Es erfolgten weiterhin die Applikation von Bepanthen®-Augensalbe zum Schutz vor intraoperativer Austrocknung der Augen, die gründliche Rasur der linken Thoraxwand und die Hautdesinfektion mit Braunoderm®. In Höhe des fünften Interkostalraumes (ICR) links wurde mit einem 11er-Einwegskalpell eine etwa 1cm lange Hautinzision, einer gedachten Linie zwischen Processus xiphoideus sterni und der Achselhöhle folgend, gesetzt. Nach Durchtrennung der thorakalen und interkostalen Muskelschichten mit der Mikroschere unter Meidung größerer Gefäße wurde die Pleura parietalis ohne Traumatisierung des Lungengewebes eröffnet. Eine vorgefertigte Schlinge aus 6/0-Seide wurde um die Wunde gelegt. Mit den feinen Pinzetten durch die Schlinge fahrend wurde der linke Lungenlappen mobilisiert und nach extrathorakal disloziert. Die Schlinge wurde am Lungenhilus festgezogen und mit mehreren Knoten gesichert (s. Abbildung 7-B). Schließlich wurde der Lungenlappen distal der Ligatur reseziert und der verbleibende Hilusstumpf reponiert (s. Abbildung 7-C). Der Thorax wurde durch Umschlingung der angrenzenden Rippen mit 6/0-Seide verschlossen (s. Abbildung 7-D/E). Nach Desinfektion des Operationssitus mit Betaisodona® wurde die Haut mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Fixierung der Maus wurde gelöst, und zur Beendigung der Narkose wurde die Isofluranzufuhr abgestellt. Mit

einsetzender Spontanatmung erfolgte die Extubation, die Überführung in einen Käfig und die Bestrahlung mittels einer Infrarot-Leuchte gegen Auskühlung. Zur Analgesie erhielten die Tiere postoperativ für drei Tage alle 12h Rimadyl® i.p.. Nach drei Tagen war die äußere Operationswunde verheilt, so dass die Tiere wieder auf Streu gehalten werden konnten.

Als Kontrollgruppe dienten Tiere, die einer Sham-Operation unterzogen wurden. Bei besagtem Eingriff wurde nach Durchtrennung der thorakalen und interkostalen Muskelschichten die Pleura nicht eröffnet, der linke Lungenlappen belassen, und es erfolgte keine Umschlingung der 5. und 6. Rippe. Die restlichen Schritte wurden analog zu der oben beschriebenen Prozedur ausgeführt.

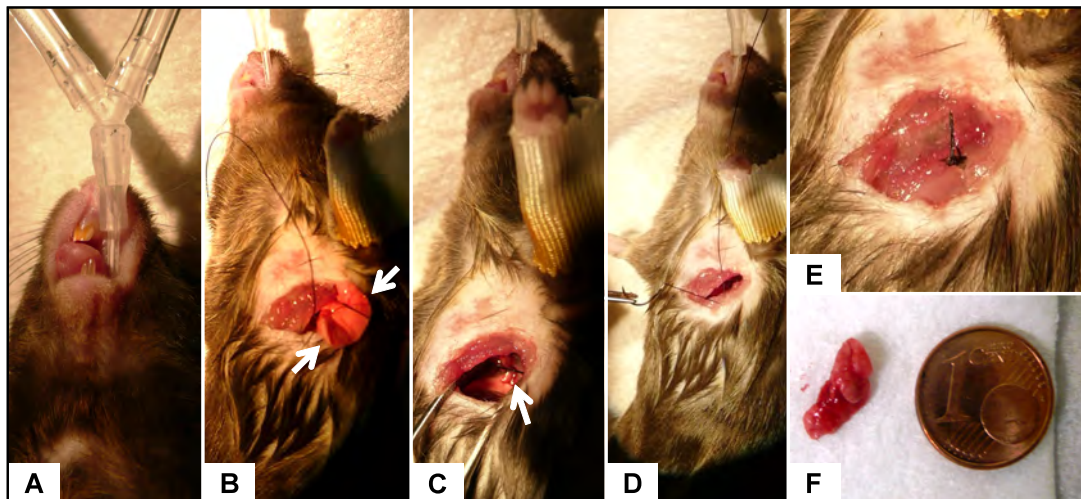


Abbildung 7: Durchführung der unilateralen Pneumektomie. A) intubierte Maus; B) hiläre Ligatur des nach extrathorakal dislozierten linken Lobus (→ li. Lobus ←); C) reponierter ligierter Hilusstumpf (→); D) Verschluss der Thorakotomie E) Rippencerclage, dadurch dichter Verschluss des Thorax; F) postoperatives, kollabiertes Lungenresektat

2.2.6 Aufbau des Arbeitsplatzes für die Lungenfixierung

Um die gute Fixierung der Maus post mortem auf der Arbeitsfläche während der Gewebeentnahme zu gewährleisten, diente eine mit Aluminiumfolie überzogene Styroporplatte als Unterlage. Die Tiere wurden auf dieser mit Präpariernadeln befestigt.

Um die Lungen mit definiertem Perfusions- / Instillationsdruck fixieren zu können, wurde ein Stativ verwendet, an dem sich in unterschiedlichen Höhen

Perfusatreservoirs mit einem Fassungsvermögen von 50ml anbringen ließen. Um identische Druckverhältnisse bei allen Messungen zu gewährleisten, wurden fixe Abstände, die in den folgenden Kapiteln benannt werden, von Reservoir zum Lungenhilus eingehalten. Als Katheter für die tracheobronchiale Instillation diente eine atraumatische Sterican® Einwegkanüle (20G). Für die Katheterisierung der A. pulmonalis wurde ein atraumatischer Pulmonalkatheter (Hugo-Sachs-Elektronik) verwendet.

2.2.7 Fixierung der Lunge

An allen ersten zehn postnatalen Tagen, sowie 2, 4, 6 und 8 Tage pPNX und 4 Tage pSH wurden die Lungen entnommen und für die weiteren immunhistochemischen Untersuchungen aufbereitet.

Um die Blutgerinnung der Maus zu inhibieren und ein gutes Perfusionsergebnis zu erzielen, wurden den Tieren 10 Minuten vor Tötung intraperitoneal 100 IE Heparin injiziert. Die Mäuse wurden dann durch Inhalation einer Überdosis Isofluran getötet.

Nach Fixierung in Rückenlage und rascher Präparation der Haut von Thorax und Abdomen wurde die Maus laparotomiert und zur sicheren Tötung die Vena cava inferior eröffnet. Sodann wurde unter Sicht Zugang zur Pleurahöhle von abdominal durch das Diaphragma geschaffen. Auf die Eröffnung des Thorax durch Sternotomie folgte die Entfernung von Thymus und Pericardium. Zur Darstellung der Trachea wurde diese von dem sie umgebenden Muskelschlauch und dessen Faszien, sowie der Schilddrüse befreit und mobilisiert. Zur späteren Fixierung der Katheter wurde jeweils ein 5/0-Polyesterfaden unter der Trachea und der A. pulmonalis hindurchgeführt. Die weiteren Schritte der Lungenfixierung waren jeweils spezifisch für die anatomischen Gegebenheiten der Lungen postnataler und pneumektomierter Tiere und werden daher für die jeweilige Gruppe gesondert beschrieben.

2.2.7.1 Fixierung der Lungen pneumektomierter Tiere

Die Trachea wurde mit der Mikroschere quer eingeschnitten, von kranial mit einer atraumatischen 20G-Sterican®-Kanüle intubiert und diese mit der vorbereiteten Fadenschlinge fixiert.

Anschließend wurden der linke Ventrikel sowie die Aorta abdominalis eröffnet, um den Abfluss des Perfusates zu gewährleisten. Der rechte Ventrikel wurde mit einer weiteren 27G-Sterican®-Kanüle punktiert und die Lunge zunächst mit ca. 2ml 1x-PBS, über eine Spritze appliziert, langsam blutfrei gespült. Der rechte Ventrikel wurde mit einer Mikroschere eröffnet; dann wurde ein Pulmonalkatheter via rechten Ventrikel in die A. pulmonalis vorgeschoben und dort mit der vorbereiteten Schlinge fixiert.

Nun begann die Blähung und Fixierung des Gewebes mittels trachealer Instillation bzw. pulmonaler Perfusion mit Hilfe von 1%-igem PFA in 1x-PBS bei definierten hydrostatischen Drücken.

Die Lungen der pneumektomierten Tiere wurden für 20 Minuten tracheobronchial mit einem Druck von 20 cmH₂O gebläht und gleichzeitig mit einem Druck von 10 cmH₂O perfusionsfixiert. Nach der Fixation wurde die Trachea caudal des Katheters mit einem weiteren 5/0-Faden abgebunden. Herz und Lunge wurden en-bloc aus dem Thorax entfernt, über Nacht bei 4°C in 1%-igem PFA in 1x-PBS nachfixiert und am nächsten Tag in 1x-PBS transferiert, in welchem sie maximal drei Tage bei 4°C gelagert wurden. Im weiteren Verlauf wurde das Herz von der Lunge abgetrennt, das Lungengewebe maschinell über Nacht dehydriert (Einbettautomat Leica ASP200S) und schließlich eine Einbettung in Paraffinblöcke (Einbett-Center Leica EG1150) durchgeführt.

2.2.7.2 Fixierung der Lungen postnataler Tiere

Aufgrund des geringen Volumens der postnatalen Lungen war es notwendig, die applizierten tracheobronchealen Instillationsdrücke und die Größen der Katheter an das Mausalter anzupassen. Lungen im Alter von 1 – 3 Tagen wurden nicht vorfixiert. P4- bis P6-Lungen wurden tracheal mit atraumatischen 27G-Sterican®-Kanülen, P7- bis P10-Lungen mit

atraumatischen 20G-Sterican®-Kanülen intubiert, welche mit einem vorbereiteten Faden fixiert wurden. Außerdem war es, bedingt durch die geringe Größe des Herzens, praktisch nicht möglich, die Perfusion mit einem Pulmonalkatheter durchzuführen, so dass sich die Perfusionsfixierung auf das vorsichtige Durchspülen der Lunge ab P8 beschränkte. Dazu wurde der rechte Ventrikel mit einer 27G-Sterican®-Kanüle punktiert und, wie oben beschrieben, linker Ventrikel und Aorta abdominalis zum Abfluss des Perfusates eröffnet. Das pulmonale Gefäßsystem wurde mit 2ml 1%-igem PFA in 1x-PBS gespült. Die an das postnatale Alter angepassten Fixationsparameter sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Lungen wurden zusätzlich tracheal für 20 Minuten mit 1%-igem PFA in 1x-PBS bei Altersadaptierten Drücken gebläht und fixiert. Nach der Fixation wurde die Trachea distal des Katheters mit einem weiteren 5/0-Faden abgebunden. Herz und Lunge der perfundierten und geblähten bzw. nicht vorfixierten Proben wurden anschließend wie in Kapitel 3.2.7.1 beschrieben aufbereitet.

Tabelle 1: An das postnatale Alter angepasste Fixationsparameter.

| Alter | Tracheobronchealer Instillationsdruck (20 Minuten, mit 1%-igem PFA in PBS) | Perfusion mit 2 ml 1%-igem PFA in PBS |
|--------------|---|--|
| P 1 | Ø | Ø |
| P 2 | Ø | Ø |
| P 3 | Ø | Ø |
| P 4 | 10 cmH ₂ O (27G) | Ø |
| P 5 | 10 cmH ₂ O (27G) | Ø |
| P 6 | 15 cmH ₂ O (27G) | Ø |
| P 7 | 15 cmH ₂ O (20G) | Ø |
| P 8 | 15 cmH ₂ O (20G) | ✓ |
| P 9 | 20 cmH ₂ O (20G) | ✓ |
| P10 | 20 cmH ₂ O (20G) | ✓ |

Ø = nicht durchgeführt, ✓ = durchgeführt, (xG) = verwendete Kanülengröße in Gauge.

2.2.8 Immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemische Färbung wurde ein Protokoll entwickelt, das die gleichzeitige Färbung eines Proliferationsmarkers und eines der Zelltypisierung dienlichen Antikörpers auf einem Präparat ermöglichte. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden an Paraffinschnitten der postnatalen Lungengewebe von P1 – P10 (n=5 je Tag), sowie an Tag 2, 4, 6 und 8 nach PNX (n=5 je Tag) und 4 Tage nach Sham-Operation (pSH, n=5) durchgeführt. Zur qualitativen Darstellung von Lipofibroblasten wurden P5-Schnitte untersucht.

Mit einem Rotationsmikrotom wurden von jeder Lungenprobe jeweils vier 4µm dicke Schnitte hergestellt und im Wasserbad auf Adhäsions-Objektträger aufgebracht. Auf jeweils drei Schnitten wurden Doppelfärbungen für einen Proliferationsmarker in Kombination mit verschiedenen Zelltyp-spezifischen Proteinen hergestellt.

Zur Detektion der Proliferation diente ein Antikörper gegen das *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA). Dieses Molekül stellt eine Untereinheit der DNA-Polymerase δ dar, deren Konzentration in der S-Phase des Zellzyklus gipfelt.

Zwecks Zelltyp-Bestimmung erfolgte auf je einem der drei Schnitte die Darstellung verschiedener spezifischer Moleküle mit einem der Antikörper: *proSurfactant-Protein C* (proSPC; färbt Typ II Alveolarepithelzellen), α -*Smooth Muscle-Actin* (SMA; färbt Myofibroblasten) und Cytokeratin (färbt die Intermediärfilamente epithelialer Zellen).

Der verbleibende Schnitt diente als Negativ-Kontrolle der PCNA-Färbung mittels Maus-IgG1_κ.

Zusätzlich wurde mit einem *Adipocyte Differentiation-Related Protein* (ADFP)-erkennenden Antikörper (Abcam) qualitativ das Vorhandensein von Lipofibroblasten überprüft. Dabei kam ergänzend *Bandeiraea simplicifolia* Lectin (Sigma) zur Darstellung der extrazellulären Matrix zum Einsatz.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde standardisiert durchgeführt:

Nach Deparaffinisierung und Rehydrierung wurden die Schnitte zur Antigen-Demaskierung für 8 Minuten in 1mM EDTA in der Mikrowelle bei 630 W gekocht. Um eine unspezifische Bindung des Sekundär-Antikörpers zu

verhindern, wurde zu Beginn der Färbung mit einer 1:1-Mischung aus Ziegen Serum und 10% BSA in 1x-PBS für 1h bei Raumtemperatur geblockt. Alle weiteren Inkubationen erfolgten in einer 3% BSA + 0,2% Triton X-100 in 1x-PBS-Lösung. Als Waschpuffer diente 1x-PBS. Die verwendeten Primär-Antikörper waren anti-PCNA (BD, Verdünnung: 1:50), anti-IgG1_κ (BD, Verdünnung: 1:50) anti-SPC (Millipore, Verdünnung: 1:900), anti-SMA (Sigma, Verdünnung: 1:1000), anti-Cytokeratin (Dako, Verdünnung: 1:1000) und anti-ADFP (Abcam, Verdünnung: 1:100), *Bandeiraea simplicifolia* Lectin (Sigma, Verdünnung: 1:100). PCNA und die IgG-Negativ-Kontrolle wurden mit einem kreuzabsorbierten Ziegenantikörper, gekoppelt an Alexa 488 (Molecular Probes, Verdünnung: 1:1000), Fluoreszenz-markiert. Sekundär-Antikörper der Zelltypisierung stammten von der Ziege und waren an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa 555 (Molecular Probes, Verdünnung: 1:1000) gekoppelt. Die SMA- und Lectin-Antikörper waren bereits mit Cy3 bzw. TRITC vormarkiert. Die Inkubation mit anti-PCNA und Maus-IgG fand über Nacht bei 4°C in feuchter Atmosphäre statt, die restlichen Primär-Antikörper wurden eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Inkubationszeit der Sekundär-Antikörper betrug 45 Minuten bei RT. Auf allen Schnitten wurde anschließend eine Kernfärbung (Hoechst 33342, Verdünnung: 1:2000) über sieben Minuten durchgeführt. Das Eindecken erfolgte mit Mowiol® (CN Bioscience).

Die Auswertung der Färbungen geschah an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica) mit digitaler Bilderfassung. Für die Ermittlung der Proliferationsraten wurde von jeder Lungenprobe und für jede Zelltyp-spezifische Färbung jeweils ein Bild eines zentralen sowie eines subpleuralen Areals der Lunge bei 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Gesichtsfelder wurden zufällig gewählt. Als subpleural galten Regionen, die direkt an die Pleura viszeralis grenzten. Zentrale Areale wurden in direkter Nähe zum Hilus aufgenommen. Subpleurale Bronchien wurden nach morphologischen Kriterien so ausgewählt, dass möglichst Bronchioli terminales zu erkennen waren, die an Ductus alveolares grenzten. In den Aufnahmen der SMA-Färbungen wurden Gesichtsfelder mit Anschnitten großer Gefäße vermieden, da glatte Muskulatur der Gefäßwände nicht in die Auswertung eingingen.

Die qualitative Darstellung der Lipofibroblasten wurde aufgrund des höheren örtlichen Auflösungsvermögens durch Aufnahmen mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop (Leica) ergänzt.

2.2.9 Erhebung der Proliferationsraten

Die digital aufgenommenen Bilder (s. 2.2.8) wurden halbautomatisch mithilfe einer Bildanalyse-Software (MacBiophotonics ImageJ, v1.41a) ausgezählt. Es konnten jeweils bis zu vier verschiedene Zelleigenschaften gleichzeitig markiert werden. In jedem Gesichtsfeld der SPC- und SMA-Färbungen wurden alle Zellkerne, alle PCNA-positiven Zellkerne, alle einem untersuchten Zelltypen zugehörigen Nuclei und alle einem untersuchten Zelltypen zugehörigen sowie PCNA-positiven Zellkerne mit unterschiedlichen Markierungen versehen. Bei den Cytokeratinfärbungen wurden selektiv die Kerne von mindestens 150 Bronchialepithelzellen markiert und der Anteil der davon PCNA-positiven Zellen ermittelt. Die Anzahl der für jede Eigenschaft gesetzten Markierungen wurde von der Software addiert und tabellarisch (Excel) dokumentiert. Vergleiche der untersuchten Gruppen und Zeitpunkte untereinander wurden mit Hilfe des t-Testes für unabhängige Stichproben angestellt. Es wurden folgende Signifikanzniveaus festgelegt: P-Werte $\geq 0,05$ galten als nicht signifikant. P-Werte $< 0,05$ waren signifikant, P-Werte $< 0,01$ waren hoch signifikant und P-Werte $< 0,001$ galten als höchst signifikant. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism v5.01. Die Proliferationsraten wurden in den Verlaufsgraphiken als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (*Standars error of the mean*, SEM) aufgetragen.

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung der Proliferation

3.1.1 PCNA-Färbung proliferierender Zellen

Ein *Proliferating Cell Nuclear Antigen* – Antikörper (PCNA) aus der Maus, markiert mit dem sekundären Antikörper Alexa 488 (Ziege anti-Maus), diente der Färbung proliferierender Zellen. Die Spezifität der Antikörperbindung konnte mittels Färbung einer respektiven Negativ-Kontrolle mit Maus-IgG1_κ unter Verwendung des gleichen Sekundär-Antikörpers gesichert werden. Die Anwendung eines standardisierten Färbeprotokolls und die Applikation einer festgelegten Belichtungszeit ermöglichte die in Abbildung 8 dargestellten Aufnahmen. Dabei wurde die Belichtungszeit für jede Färbereihe anhand der Negativ-Kontrolle angepasst.

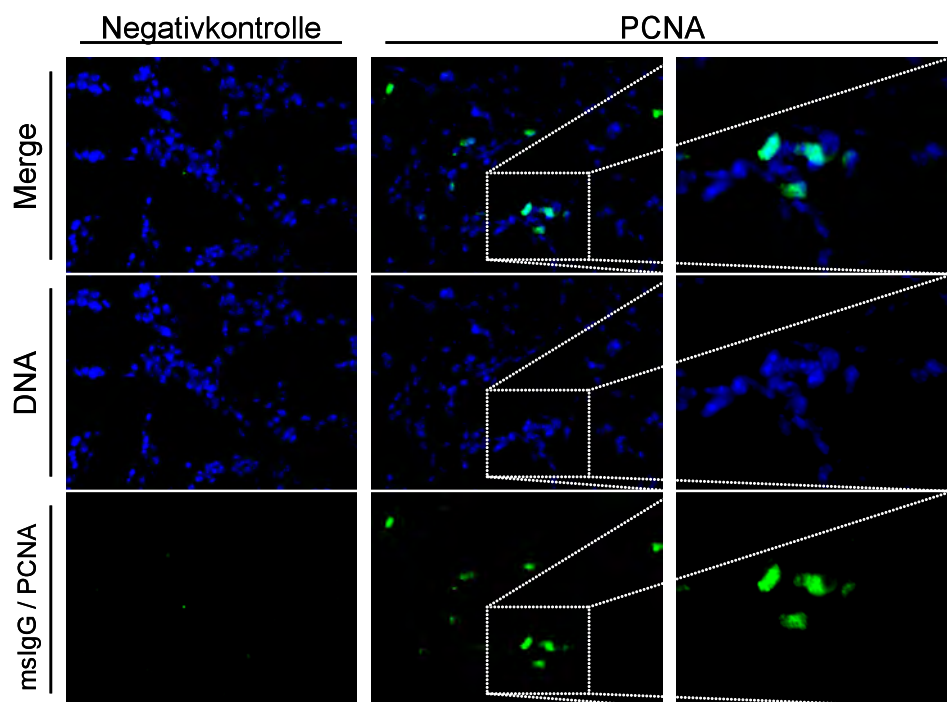


Abbildung 8: PCNA Färbung einer C57Bl6/J Wildtyp Lunge (P10). Die Negativ-Kontrollen wurden mit Maus-IgG inkubiert, welches mit Alexa 488 (grün) markiert wurde. Die Belichtungszeit, bei der kein Signal in der Negativ-Kontrolle detektierbar war bzw. eine geringere, wurde auch für die ebenfalls Alexa 488-markierten PCNA-Färbungen (grün) angewandt. Die Färbung zeigt sich Zellkern-kongruent. Zellkerne sind gegengefärbt mit Hoechst 33342 (blau). Vergrößerung: 400x. Rechte Spalte: Ausschnitts-Vergrößerung.

3.1.2 Detektion von Bronchialepithelzellen durch Cytokeratin-Färbung

Die Auffindung von Bronchialepithelzellen erfolgte durch Cytokeratin-Darstellung (s. Abbildung 9). Die typische Zellmorphologie des Bronchialepithels ließ sich an den kubischen Zellen mit basalständigen Nuclei erkennen. Da die Kerne von Fluoreszenz-markiertem Zytoplasma eingeschlossen wurden, ließ sich die Zuordnung der Nuclei zur jeweiligen Zelle gut bewerkstelligen. Da sich die Belichtungszeit nach der optimalen Darstellung des Bronchus richtet, werden das umliegende Bindegewebe, Alveolarsepten sowie Gefäße von der Färbung ausgespart. Somit wird die korrekte Quantifizierung der Proliferationsraten gewährleistet.

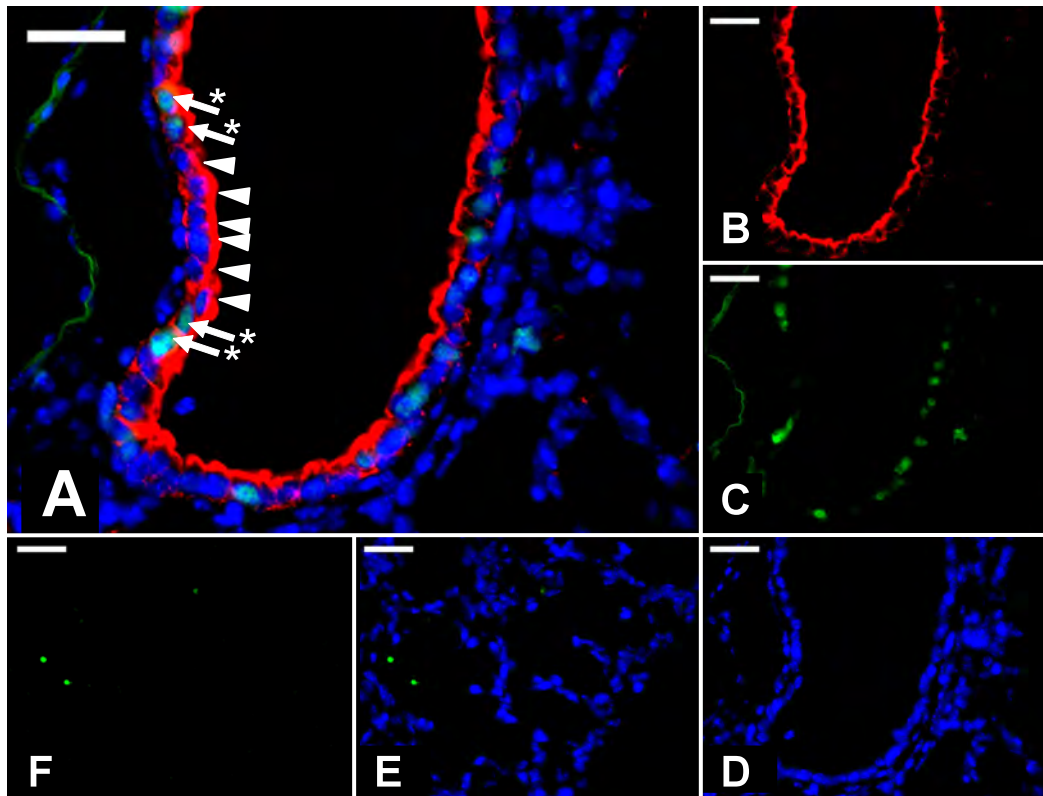


Abbildung 9: Cytokeratin-Darstellung bei einer C57Bl6/J-Wildtyp-Lunge (P7).

A) Überlagerungsbild **B)** Cytokeratin (rot) **C)** PCNA (grün) **D)** Zellkerne (blau); Negativ-Kontrolle: **E)** Maus-IgG (grün) + Zellkerne (blau) **F)** Maus-IgG (grün).

► Bronchialepithelzellen; *→ PCNA-positiver Nuclei. Kernfärbung jeweils Hoechst 33342.

Balken = 30 µm.

3.1.3 Darstellung von Typ II Alveolarepithelzellen anhand von Prosurfactant-Protein C

Es zeigt sich die typische Lokalisation von AE2 (s. Abbildung 10). Die ubiquitär in den Alveolarsepten verteilten, kubischen Zellen, deren zentraler Nucleus von einem gleichmäßigen Zytoplasmasaum umgeben ist, waren bevorzugt zum Alveolarlumen orientiert. Gefäße und Bronchi waren frei von gefärbten Zellen. Eine Ausnahme stellten die terminalen Abschnitte von einigen subpleuralen Bronchien dar, denn in den so genannten bronchoalveolären *duct junctions* (Übergang der Bronchioli terminales in die Ductus alveolares) fanden sich vereinzelt SPC-positive Zellen im Bronchialepithel. Es handelte sich hierbei wahrscheinlich um bronchoalveoläre Stammzellen (*Bronchoalveolar Stem Cells*, BASCs). Die Zugehörigkeit der einzelnen Nuclei zum interessierenden Zellkompartiment ließ sich bei dieser Färbung sehr gut bestimmen.

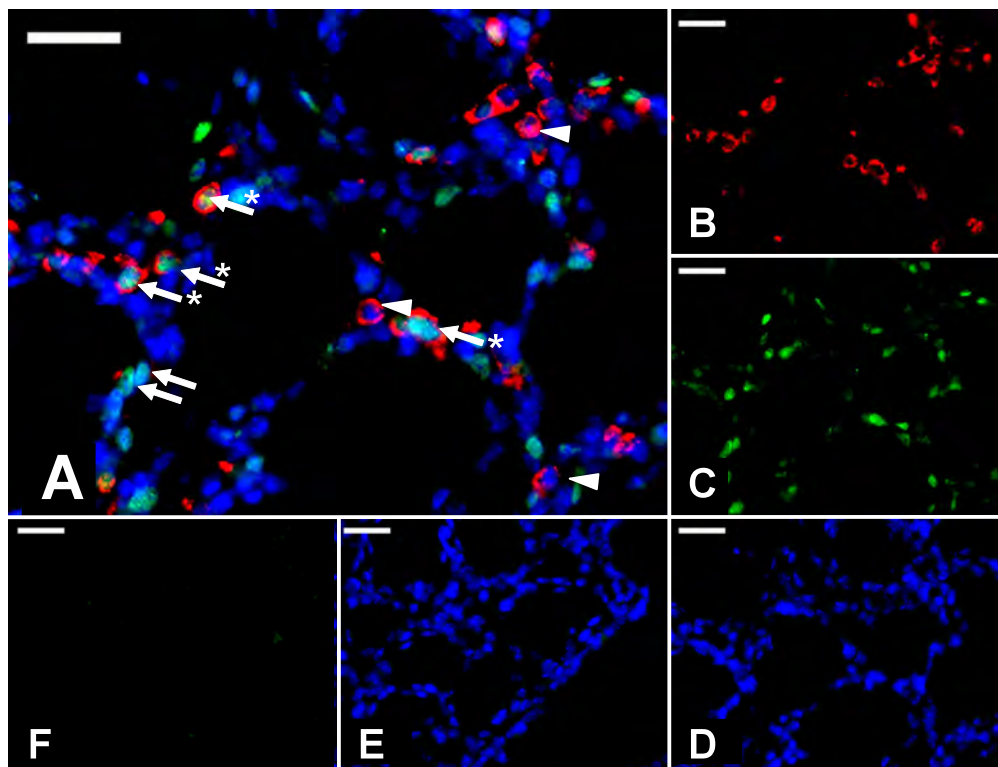


Abbildung 10: Darstellung von AE2 bei einer C57Bl6/J-Wildtyp-Lunge (P5) anhand von pro-SPC. A) Überlagerungsbild B) ProSPC (rot) C) PCNA (grün) D) Zellkerne (blau); Negativ-Kontrolle: E) Maus-IgG (grün) + Zellkerne (blau) F) Maus-IgG (grün). ► Typ II Alveolarepithelzellen; *→ pro-SPC & PCNA positive Zellen; → PCNA positive Zellen. Kernfärbung jeweils mit Hoechst 33342. Balken = 30 µm.

3.1.4 Darstellung von Myofibroblasten anhand von α – *Smooth Muscle-Actin*

Es wurden ausschließlich die in den Alveolarsepten lokalisierten Myofibroblasten in die Untersuchung einbezogen. Gesichtsfelder mit Anschnitten der Muskulatur von Bronchi bzw. Gefäßen wurden verworfen. Die Nuclei der länglichen Myofibroblasten wurden von den zytoplasmatischen Aktinfilamenten eingeschlossen. Querschnitte der Muskelzellen erleichterten die klare Zuordnung eines Kernes zu einer Zelle (s. Abbildung 11-A, ► rechts unten). Bei Längsschnitten (s. Abbildung 11-A, ► Mitte) war die objektive Quantifizierung erschwert.

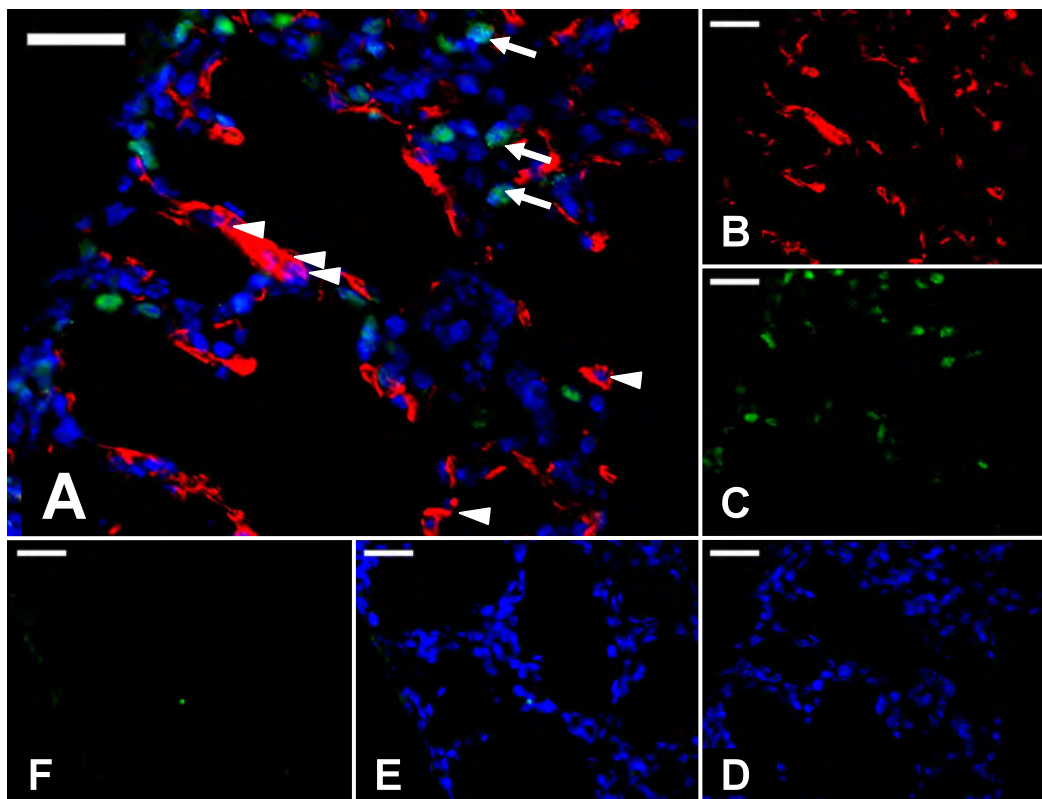


Abbildung 11: Darstellung von α -Smooth Muscle-Actin bei einer C57Bl6/J-Wildtyp-Lunge (P5). A) Überlagerungsbild B) α -SMA-Cy3 (rot) C) PCNA (grün) D) Zellkerne (blau); Negativ-Kontrolle: E) Maus-IgG (grün) + Zellkerne (blau) F) Maus-IgG (grün). ► Myofibroblasten; → PCNA positive Zellen. Kernfärbung jeweils mit Hoechst 33342. Balken = 30 μ m.

3.2 Qualitative Darstellung von Lipofibroblasten

Die Färbung der Lipofibroblasten erfolgte mit einem Anti-ADFP-Antikörper. Auf Paraffinschnitten fünf Tage alter Mäuselungen ließen sich homogen über die Lunge verteilte Lipofibroblasten in den Alveolarsepten nachweisen. Zum Teil lagen diese am wahrscheinlichen Entstehungsort von sekundären Septen bzw. deren apikaler Spitzen (s. Abbildung 12-A, ►).

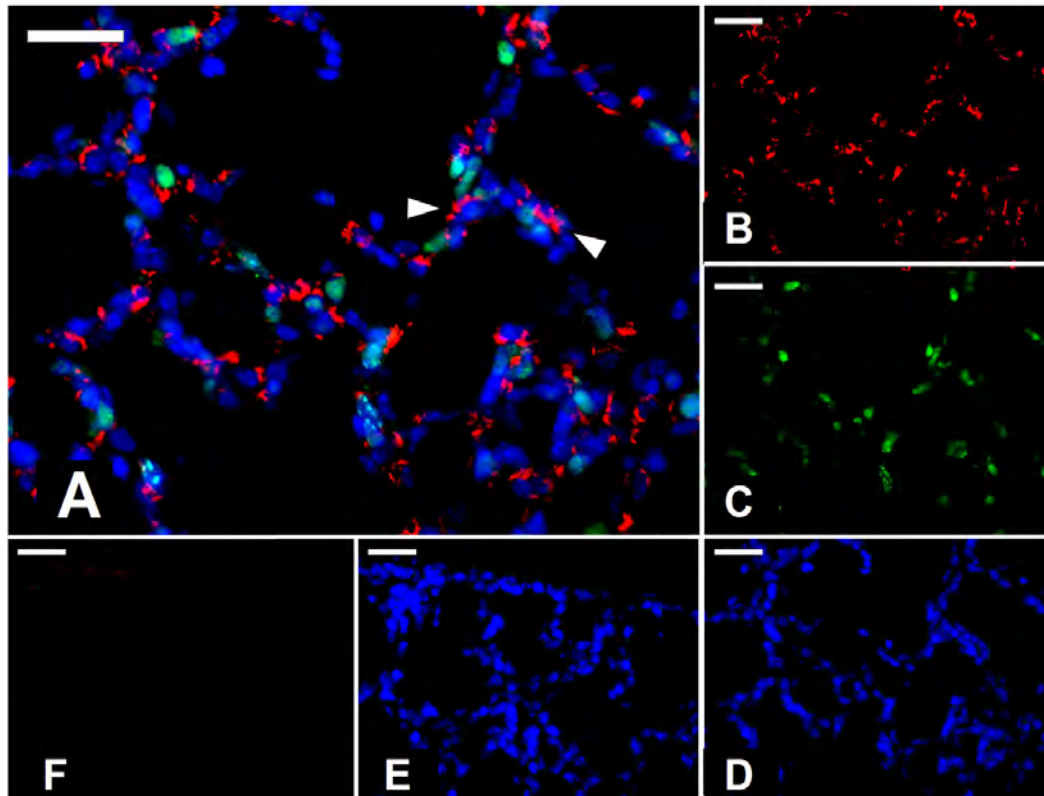


Abbildung 12: Darstellung von Lipofibroblasten mit Hilfe einer ADFP-Lokalisation bei einer C57Bl6/J-Wildtyp-Lunge (P5). **A)** Überlagerungsbild **B)** ADFP (rot) **C)** PCNA (grün) **D)** Zellkerne (blau) **E)** Negativ-Kontrolle für ADFP durch Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa 555 (gt x ms) (rot) + Zellkerne (blau) **F)** Sekundärantikörper Alexa 555 (gt x ms) (rot). Es zeigten sich homogen über die Lunge verteilte Lipofibroblasten in den Alveolarsepten (►◄). Balken = 30 µm.

Aufgrund der diffusen Verteilung der Lipidvakuolen im Zytoplasma der Lipofibroblasten war keine genaue Quantifizierung der Proliferationsraten von Lipofibroblasten möglich. Daher wurde die ADFP Färbung durch eine simultane Färbung mittels *Bandeiraea simplicifolia* Lectin (Sigma), welche Bestandteile der extrazellulären Matrix bindet, ergänzt. Auf diese Weise war die Erkennung von Zellgrenzen besser möglich (s. Abbildung 13 A-D).

Für die zukünftige Untersuchung dieses Zelltyps empfiehlt sich aufgrund der höheren Ortsauflösung die Verwendung eines konfokalen Laserscan-Mikroskops (s. Abbildung 13 E-H) einschließlich der Anfertigung von Z-Achsen Schichtaufnahmen. Bisher konnte die gleichzeitige Färbung von ADFP, Lectin und PCNA zur Erhebung der Proliferationsraten noch nicht hinreichend etabliert werden.

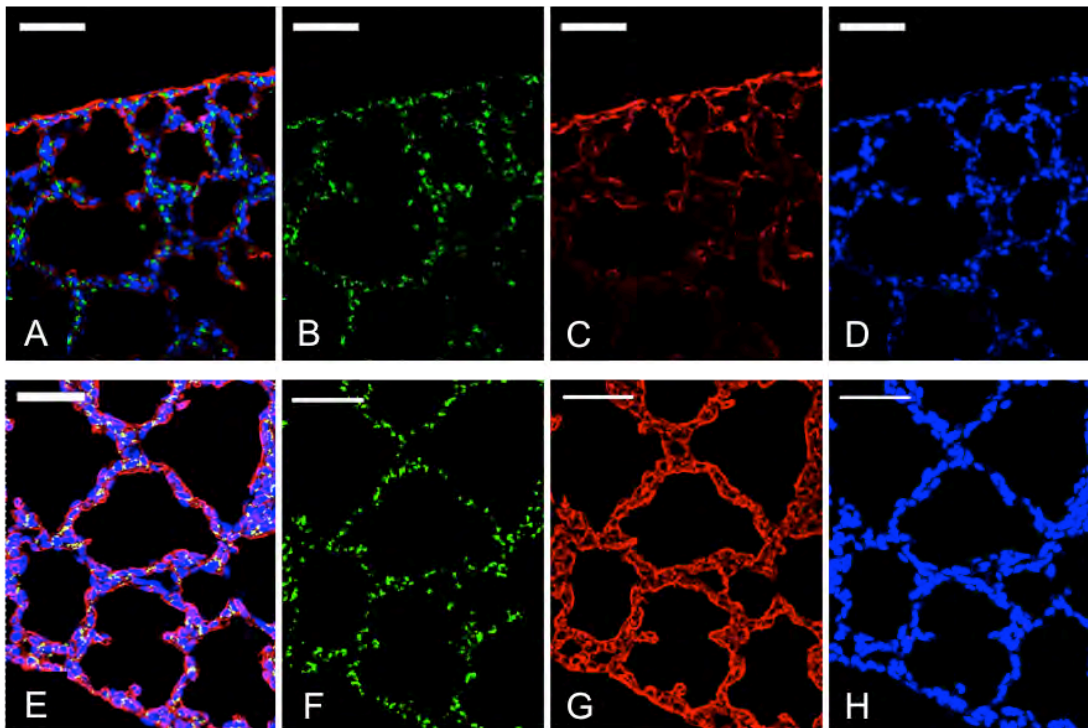


Abbildung 13: Parallele Darstellung von ADFP und Lectin (P5) in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie (A – D) und in der konfokalen Laserscanmikroskopie (E – H): **A) + E)** Überlagerungsbild **B) + F)** ADFP (grün) **C) + G)** Lectin-Cy3 (rot) **D) + H)** Zellkerne (blau). Die Färbung der extrazellulären Matrix mit Lectin ermöglichte die Erkennung der Zellgrenzen und erleichterte somit eine denkbare zukünftige Quantifizierung der Proliferationskinetik der Lipofibroblasten. Die bessere Ortsauflösung der konfokalen Mikroskopie und die Anfertigung von Schichtaufnahmen verbesserte erneut die Erkennung der Zellgrenzen zur Quantifizierung von Proliferationsraten. Balken in A) – D) = 60 μm / in E) - F) = 30 μm .

3.3 Statistische Auswertung

3.3.1 Globale Proliferationsraten

3.3.1.1 Globale Proliferation im postnatalen Lungenwachstum

In die Datenerhebung gingen je Zeitpunkt zwei zentrale sowie zwei subpleurale Gesichtsfelder von fünf Versuchstieren ($n=5$) bei 400-facher Vergrößerung ein, auf denen durchschnittlich 200 Zellkerne angeschnitten waren. Somit ergaben sich die errechneten Proliferationsraten für jeden Zeitpunkt aus der Auswertung von ca. 4000 Zellkernen.

An den ersten beiden Tagen nach Geburt zeigte das Lungengewebe einen geringen Anteil mitotischer Zellen von ca. 4% (P1: $4,38 \pm 0,43\%$; P2: $4,6 \pm 0,61\%$, s. Abbildung 14). Die Proliferationsraten stiegen anschließend steil auf ca. das Doppelte an und erreichten an P5 mit $10,84 \pm 0,99\%$ einen Gipfel. Der Anstieg der Mitosen von P2 zu P5 war mit $P < 0,001$ hoch signifikant. Im Verlauf zeigte sich zwischen P3 und P7 ein Plateau mit sich nicht signifikant von einander unterscheidenden Teilungsraten zwischen $10,84 \pm 0,99\%$ (P5) und $8,48 \pm 0,69\%$ (P7) ($P = 0,058$). Von P7 auf P8 erhöhte sich die Proliferation wiederum deutlich ($P < 0,01$) und bildete mit einem Anteil von $11,43 \pm 0,82\%$ proliferierender Zellen einen zweiten Gipfel. Bis P10 kehrten die Teilungsraten auf den Basalwert zurück (P10: $4,22 \pm 0,51\%$).

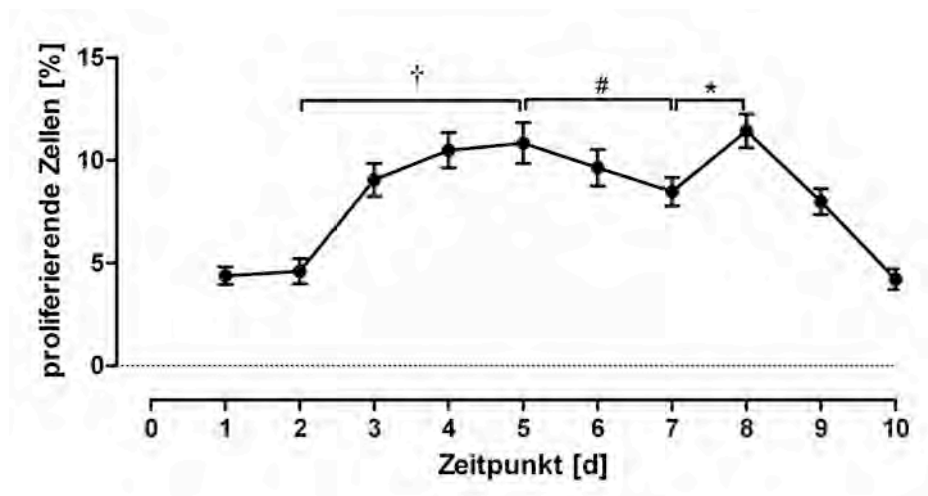


Abbildung 14: Globale Proliferationsraten in der postnatalen Alveolarisierung. Die Teilungsraten blieben in den ersten zwei Tagen nach Geburt konstant. Ab P3 zeigte sich

eine deutliche Akzeleration der Zellteilungs-Geschwindigkeit mit zwei Gipfeln an P5 und P8. An P10 kehrte die Mitoserate wieder auf den Basalwert zurück. Der Anteil proliferierender Zellen ist in Prozent bezogen auf die Gesamtzellzahl der untersuchten Gesichtsfelder aufgetragen. (MW \pm SEM; n=5; ca. 4000 gezählte Zellkerne pro Lunge; #: n.s.; *: P<0,01; †: P<0,001)

3.3.1.2 Vergleich zwischen zentralen und subpleuralen Arealen

Der Vergleich zwischen zentralen und subpleuralen Arealen zeigte in der postnatalen Alveolarisierung keine eindeutige spatiotemporale Differenz der Mitoseraten (s. Abbildung 15). Der verhaltene Anstieg der Teilungen in den ersten zwei postnatalen Tagen war sowohl zentral als auch peripher erkennbar. Die Raten schwankten zwischen $4,27 \pm 0,72\%$ an P1 (zentral) und $4,79 \pm 0,87\%$ an P2 (subpleural) (MW \pm SEM). Statistisch ließ sich kein Unterschied nachweisen.

Subpleural stiegen die Teilungsraten bis P3 steiler an als zentral. Die Werte unterschieden sich jedoch nicht signifikant (P=0,549). Peripher bildete sich im Verlauf (P3 – P9) ein Plateau mit konstanten Mitoseraten aus, bevor diese von P9 auf P10 auf die Basalrate ($4,80 \pm 0,86\%$) zurückfielen.

In zentralen Abschnitten der Lunge zeigte sich ein Proliferationsverlauf, der die Zweigipfeligkeit, welche sich bereits im globalen Verlauf (vgl. Abbildung 14) erkennen ließ, akzentuierte. Die Raten fielen vom ersten Gipfel an P4 ($11,83 \pm 1,15\%$) signifikant bis P7 ($7,60 \pm 0,71\%$; P < 0,01) ab, stiegen dann aber wieder auf einen zweiten Gipfel an P8 an ($12,06 \pm 1,47\%$; P < 0,05) und kehrten anschließend bis P10 auf die Basalrate zurück.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den zentralen und subpleuralen Proliferationsraten wurde nur an P9 erreicht (P < 0,05). Tendenzen zeigten sich zusätzlich an P3 und P6 mit jeweils höheren subpleuralen Mitoseraten (P3: P = 0,055, P6: P = 0,053).

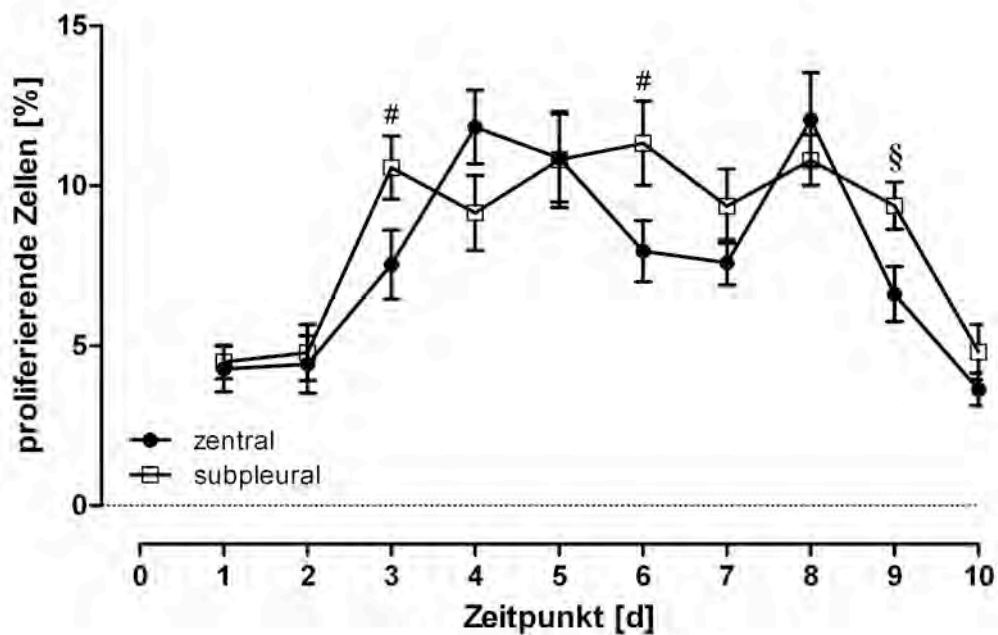


Abbildung 15: Globale Proliferationsraten in zentralen und subpleuralen Abschnitten der postnatalen Lunge. Subpleural zeigte sich ein Plateau mit annähernd konstanten Mitoseraten von P3 bis P9. Zentral ergab sich ein zweigipfelter Verlauf, der den globalen Verlauf akzentuierte. Evidenz, dass Lungengewebe in der Peripherie höhere Proliferationsraten aufweist, ließ sich hier allerdings statistisch nur für P9 nachweisen. (MW \pm SEM; n=5; #: n.s.; §: P<0,05)

3.3.1.3 Globale Proliferation beim kompensatorischen Lungenwachstum

In die Datenerhebung gingen, wie auch bei der postnatalen Reihe, je Zeitpunkt zwei zentrale sowie zwei subpleurale Gesichtsfelder von je fünf Versuchstieren ein auf denen durchschnittlich 200 Zellkerne angeschnitten waren. Somit ergeben sich die errechneten Proliferationsraten jedes postoperativen Tages aus der Auswertung von ca. 4000 Zellkernen.

Auch in der post-Pneumektomie-Alveolarisierung zeigte sich ein verzögerter Anstieg der Mitoseraten. Der Basalwert lag an Tag 2 pPNX bei $0,65 \pm 0,16\%$ (MW \pm SEM) proliferierender Zellen. An Tag 4 pPNX erfolgte ein signifikanter Anstieg der Teilungsraten auf $2,17 \pm 0,39\%$. Nach einem Gipfel an Tag 6 pPNX ($6,68 \pm 0,90\%$) fiel die Teilungsrate an Tag 8 pPNX auf $4,04 \pm 0,40\%$. Die Veränderungen von Tag zu Tag waren in der Gesamtheit statistisch

nachweisbar (s. Abbildung 16). Im Vergleich zu den Sham-operierten Kontrolltieren führte die Pneumektomie bereits an Tag 4 pPNX zu einem signifikanten Anstieg der Zellteilungen ($P < 0,001$). Die Basalrate der proliferierenden Zellen in der adulten Mäuselunge (Alter: acht Wochen) pSH lag mit $0,38 \pm 0,11\%$ deutlich unter der der pneumektomierten Tiere.

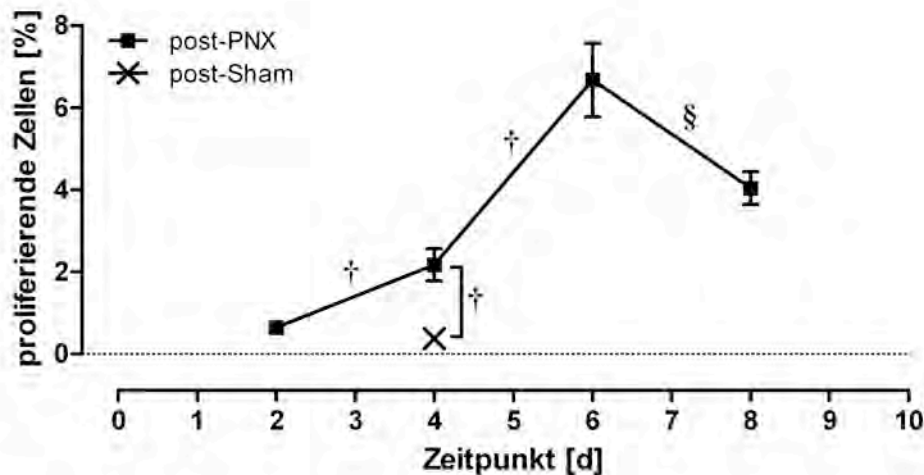


Abbildung 16: Globale Proliferation nach Pneumektomie / Sham-Operation. Nach leichtem Anstieg der Teilungsraten bis Tag 4 pPNX bildete sich an Tag 6 pPNX ein Gipfel mit $6,68 \pm 0,90\%$ proliferierender Zellen. Die Proliferationsraten sanken bis Tag 8 pPNX nicht auf die Basalrate ab. An Tag 4 pPNX gab es einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu acht Wochen alten, Sham-operierten Tieren. (MW \pm SEM; §: $P < 0,05$; †: $P < 0,001$)

3.3.1.4 Globale Proliferationsraten zentraler und subpleuraler Areale nach Pneumektomie

In beiden untersuchten Arealen der Lunge führte die Pneumektomie an Tag 4 pPNX zu signifikant höheren Mitoseraten verglichen mit gleichaltrigen Sham-operierten Kontrollmäusen (zentral: $P < 0,05$, subpleural: $P < 0,001$). Subpleural zeigte sich eine signifikant schnellere und ausgeprägtere Erhöhung der Proliferationsraten. Die Teilungen lagen an Tag 4 pPNX subpleural bei $3,25 \pm 0,58\%$ (MW \pm SEM) und zentral deutlich niedriger bei $1,10 \pm 0,25\%$ (s. Abbildung 17). In zentralen Abschnitten erreichte die Erhöhung der Teilungsrate erst an Tag 6 pPNX Signifikanz (im Vergleich zu 4d pPNX). Die Tendenz zu erhöhter subpleuraler Mitoseaktivität im Vergleich

zu zentralen Teilungsraten an Tag 6 pPNX konnte statistisch nicht untermauert werden.

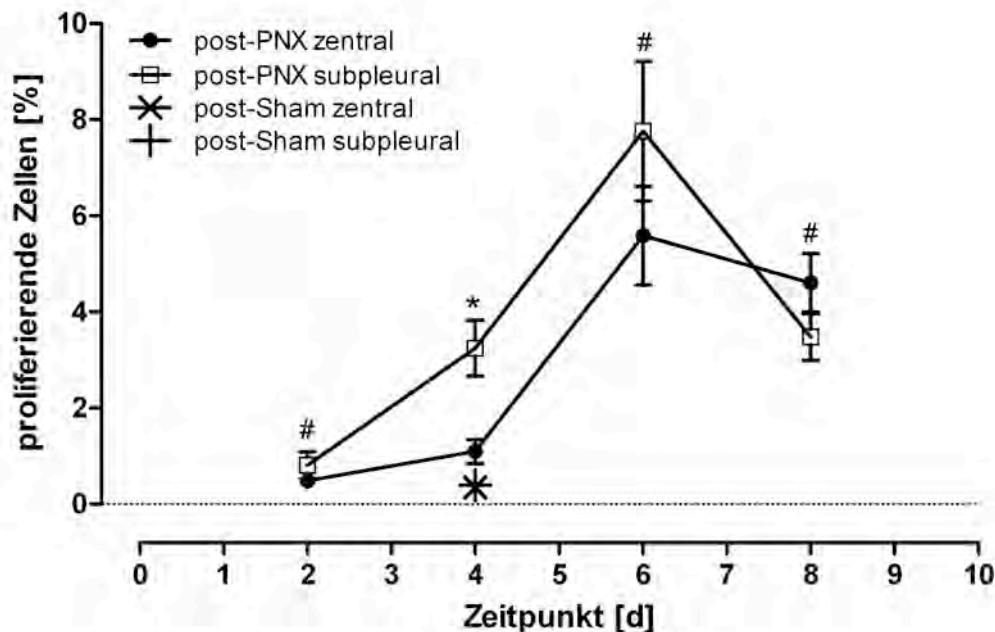


Abbildung 17: Globale Proliferationsraten in zentralen und subpleuralen Abschnitten nach Pneumektomie. Es zeigte sich eine Tendenz zu höheren Zellteilungsraten in subpleuralen Arealen der Lunge. Signifikant erhöhte Werte gab es jedoch nur an Tag 4 pPNX. Die Phase vermehrter Zellteilungen war bis Tag 8 pPNX noch nicht abgeschlossen. (MW \pm SEM; n=5; #: n.s.; *: P<0,01)

3.3.1.5 Vergleich der globalen Proliferationsraten bei postnatalem und post-PNX / -Sham-Lungenwachstum

Zu jedem untersuchten Zeitpunkt lagen im postnatalen Lungenwachstum signifikant höhere Proliferationsraten vor als bei der post-Pneumektomie-Alveolarisierung (s. Abbildung 18). Die Basalrate der Zellteilungen bei adulten Mäusen (Alter: acht Wochen) 4 Tage nach Sham-Operation, deren Wert als Grundrate der physiologischen Zellerneuerung zu betrachten war, lag bei $0,38 \pm 0,11\%$ (MW \pm SEM). Diese unterschied sich nicht signifikant von der Proliferationsrate zwei Tage pPNX ($0,65 \pm 0,16\%$; P = 0,17). Im Gegensatz dazu lag sie am ersten Tag postnatal bereits bei $4,38 \pm 0,43\%$. Die steile Zunahme des Anteils sich teilender Zellen begann postnatal bereits an P3, wohingegen nach Pneumektomie die Proliferationszunahme langsamer einsetzte und erst sechs Tage pPNX ein Gipfel erreicht wurde.

Die post-Pneumektomie-Alveolarisierung wies nur einen Proliferationsgipfel um den sechsten Tag pPNX herum auf.

Bei postnatalen Lungen steigerte sich der Anteil proliferierender Zellen maximal um den Faktor 2,6 (P1 → P8), nach Pneumektomie sogar um das 10,3-fache (d2 → d6).

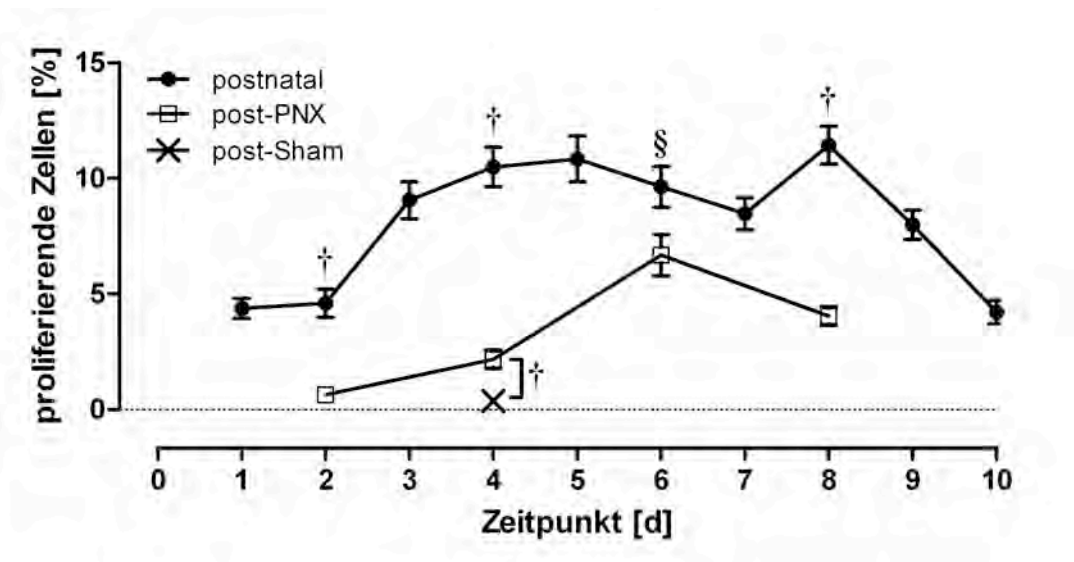


Abbildung 18: Vergleich der globalen Proliferationsraten bei postnatalem und post-PNX / -Sham-Lungenwachstum. Die Zellteilungsraten der postnatalen und der pPNX-Reihen unterschieden sich zu jedem gemeinsam untersuchten Zeitpunkt signifikant. (MW ± SEM; n=5; § : P<0,05; †: P<0,001)

3.3.1.6 Vergleich der globalen Proliferationsraten im postnatalen Lungenwachstum und nach Pneumektomie/ Sham-Operation in zentralen und subpleuralen Arealen

In subpleuralen Anteilen der postnatalen Lunge bildete sich von P3 bis P9 ein Plateau mit konstant höheren Proliferationsraten aus (vgl. 3.3.1.2). Auch die post-Pneumektomie-Alveolarisierung zeigte durchgängig subpleural größere Proliferationsraten als zentral. Separat betrachtet, unterschieden sich die Anteile proliferierender Zellen zu fast allen untersuchten Zeitpunkten (Ausnahme: P6 / 6d pPNX) signifikant (P6 – 6d pPNX subpleural: P = 0,086, zentral: P = 0,11; s. Abbildung 19). Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 20 die original IF-Färbungen dargestellt. Es zeigte sich an Tag 6 nach Geburt bzw. PNx vermehrte Mitoseaktivität im Vergleich zu Tag 2 bzw. 10. In den

Färbungen der Kontrolltiere 4 Tage nach Sham-OP ist keine nennenswerte Proliferation detektierbar.

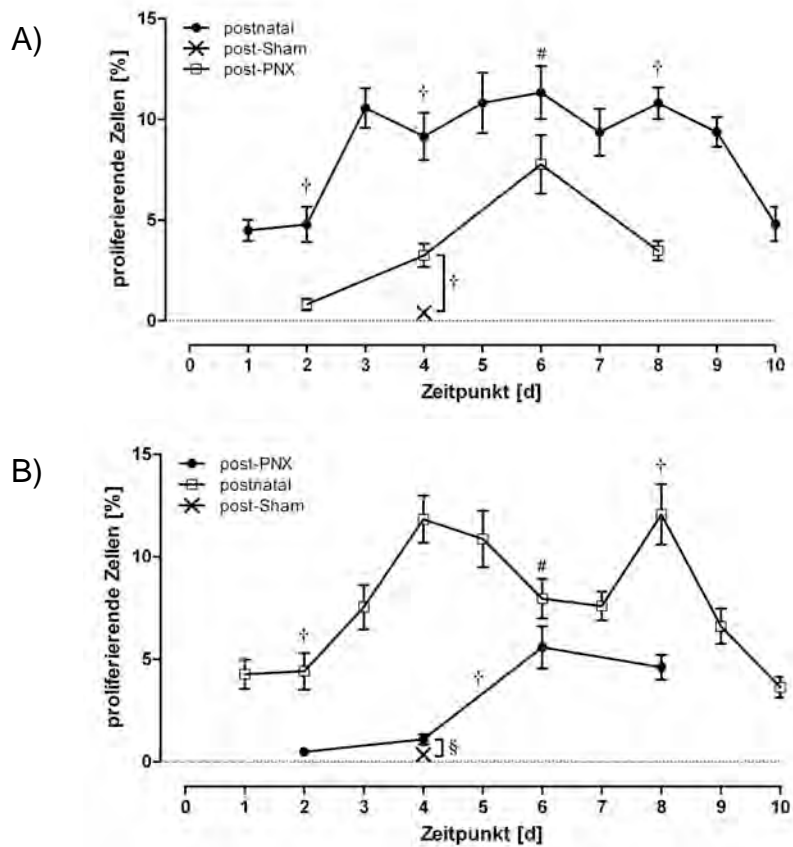


Abbildung 19: Proliferationsraten postnatal und nach Pneumektomie / Sham-Operation in A) subpleuralen und B) zentralen Arealen. (MW \pm SEM; n=5; #: n.s.; §: P<0,05; †: P<0,001;)

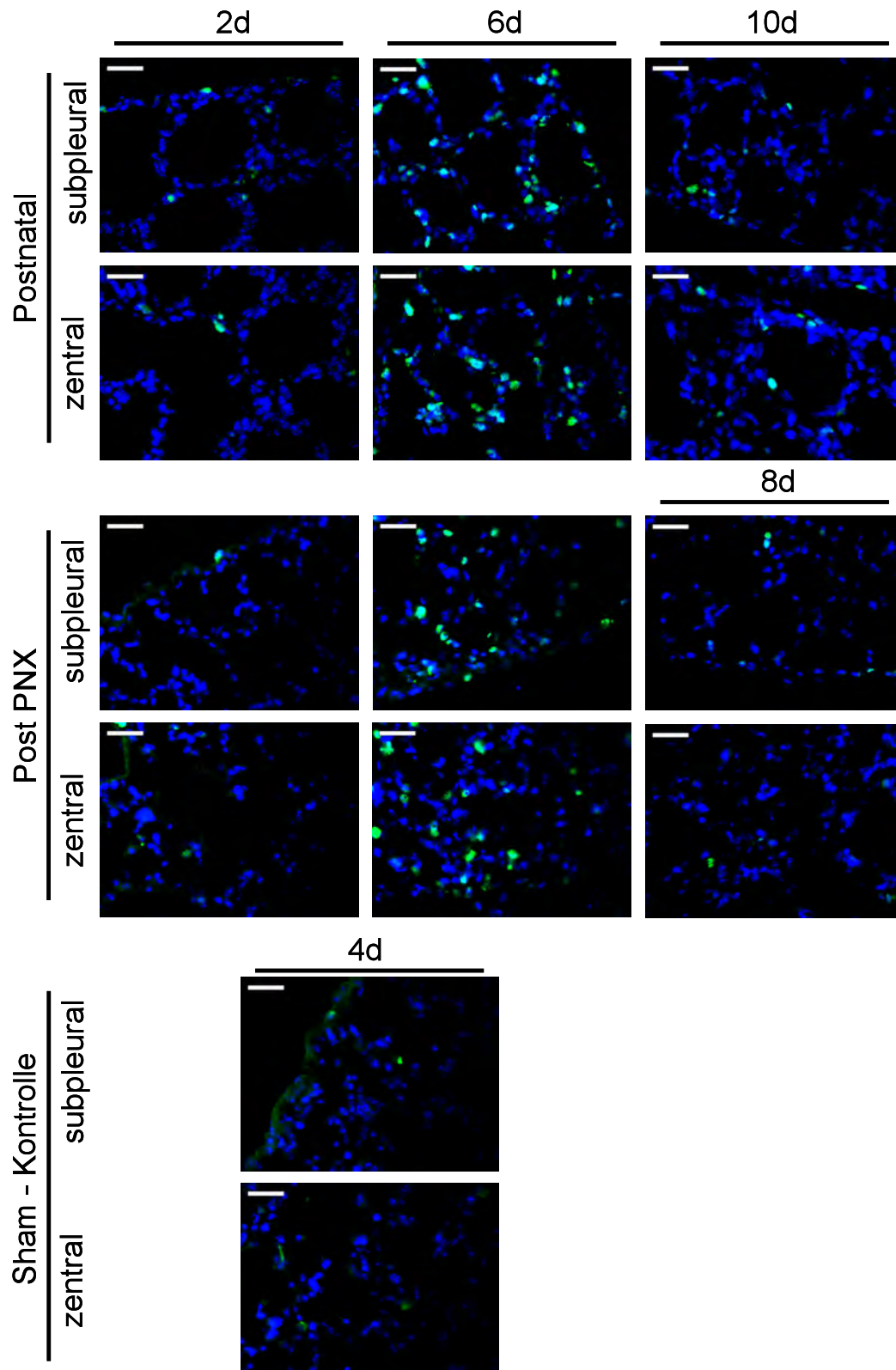


Abbildung 20: Beispiel-Bilder zur Veranschaulichung der Proliferations-Peaks. Alle Bilder sind *Overlays* aus PCNA (grün) und Zellkernen (blau). Die wenigen PCNA-positiven Zellen in den Negativ-Kontrollen vier Tage nach Sham-Operation repräsentieren die basale Zellteilungsrate in adultem Lungengewebe. Balken = 30µm.

3.3.2 Zelltyp-spezifische Proliferationsraten

3.3.2.1 Typ II Alveolarepithelzellen (AE2)

3.3.2.1.1 Globale Proliferationsraten

An den ersten drei postnatalen Tagen waren kaum Zellteilungen erkennbar. Danach erfolgte bis P5 ein signifikanter Anstieg auf ca. 20% ($P < 0,001$). Dieses Niveau hielt sich bis P8 mit einem Maximum an P7 ($24,33 \pm 2,05\%$). Ab P8 fallen die massiv erhöhten Zellteilungsraten rapide ab (P8 – P10 $P < 0,01$; s. Abbildung 21-B).

Nach Pneumektomie zeigte sich ebenfalls ein verzögerter Proliferations-Beginn. 2d pPNX waren wie auch in der Sham-Negativkontrolle keine PCNA-positiven AE2 detektierbar. Analog zu den globalen Proliferationsraten (s. 3.3.1.3) zeigte sich ein Maximum an Tag 6 pPNX mit $33,48 \pm 6,10\%$, welches um 10 Prozentpunkte höher als das postnatale Maximum war. Alle Messwerte unterscheiden sich im Verlauf signifikant voneinander. (s. Abbildung 21-C)

In Abbildung 21-A sind die Verläufe beider Alveolarisierungsmodi gegenübergestellt. Postnatal wie auch nach PNX ist ein verzögerter Beginn der Proliferation zu erkennen. Die scheinbar höheren Teilungsraten an Tag 4 und Tag 6 sind statistisch nicht belegbar (Tag 6: $P = 0,052$). Nach Pneumektomie fallen die Raten schneller ab als nach Geburt. Während der Anteil proliferierender AE2 an P8 mit $21,37 \pm 4,23\%$ noch stark erhöht ist, liegen die Werte 8d pPNX mit $9,88 \pm 2,26\%$ bereits signifikant tiefer (MW \pm SEM; $P < 0,05$).

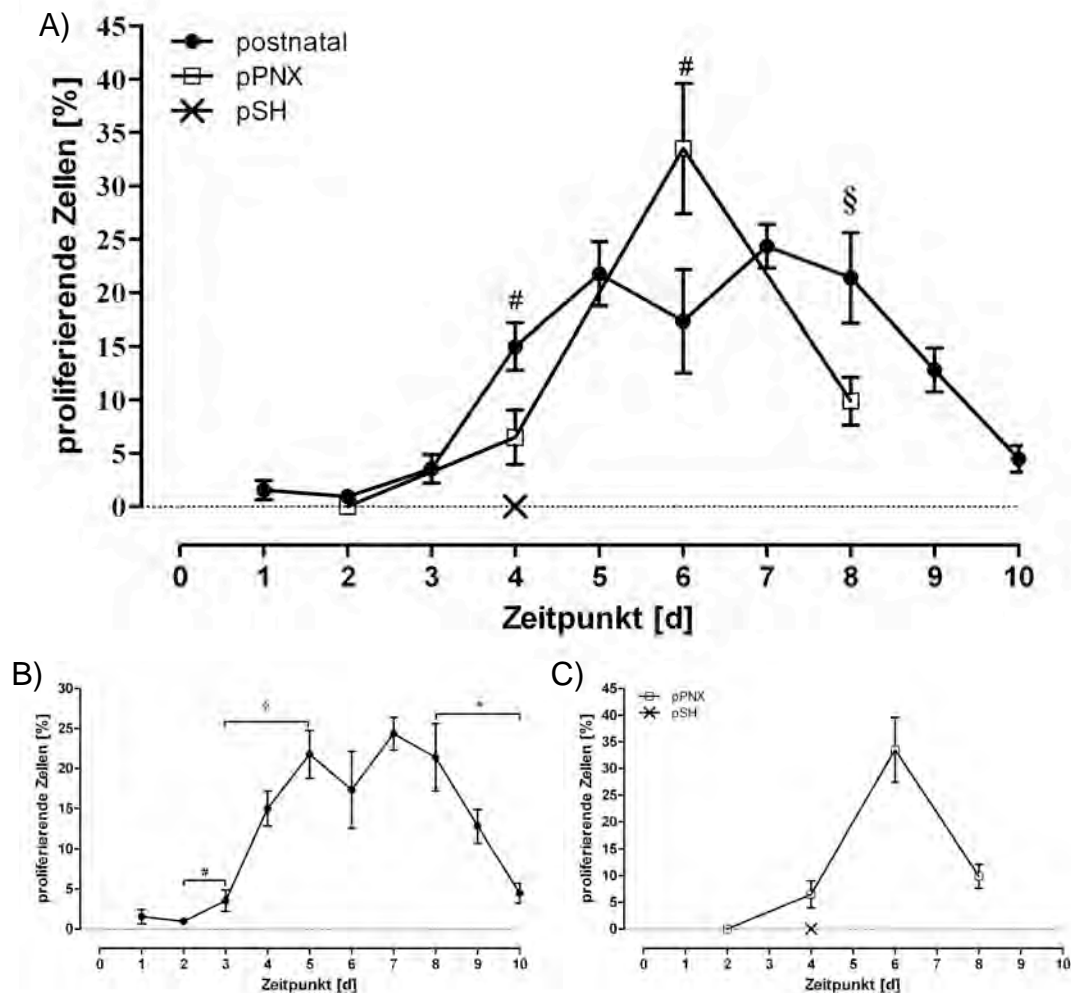


Abbildung 21: Globale Proliferationsraten der Typ II Alveolarepithelzellen. A) postnatal und nach PNX / Sham-Operation im Vergleich, B) postnatal, C) nach PNX / Sham-Operation. (MW \pm SEM; n=5; #: n.s.; §: P<0,05; *: P<0,01; †: P<0,001)

3.3.2.1.2 Postnatale zentrale und subpleurale Proliferationsraten

Die subpleuralen Mitoseraten steigerten sich ab P3 relativ zur Basalrate, erreichten an P5 einen Gipfel mit $26,16 \pm 3,43\%$ (MW \pm SEM) und fielen daraufhin wieder ab. Zentral wurde das Maximum erhöhter Zellteilungen mit $27,46 \pm 5,92\%$ erst an P8 erreicht. Dieser Unterschied muss jedoch als

Tendenz betrachtet werden, da sich zentrale und subpleurale Messwerte in keinem Fall signifikant voneinander unterscheiden (s. Abbildung 22).

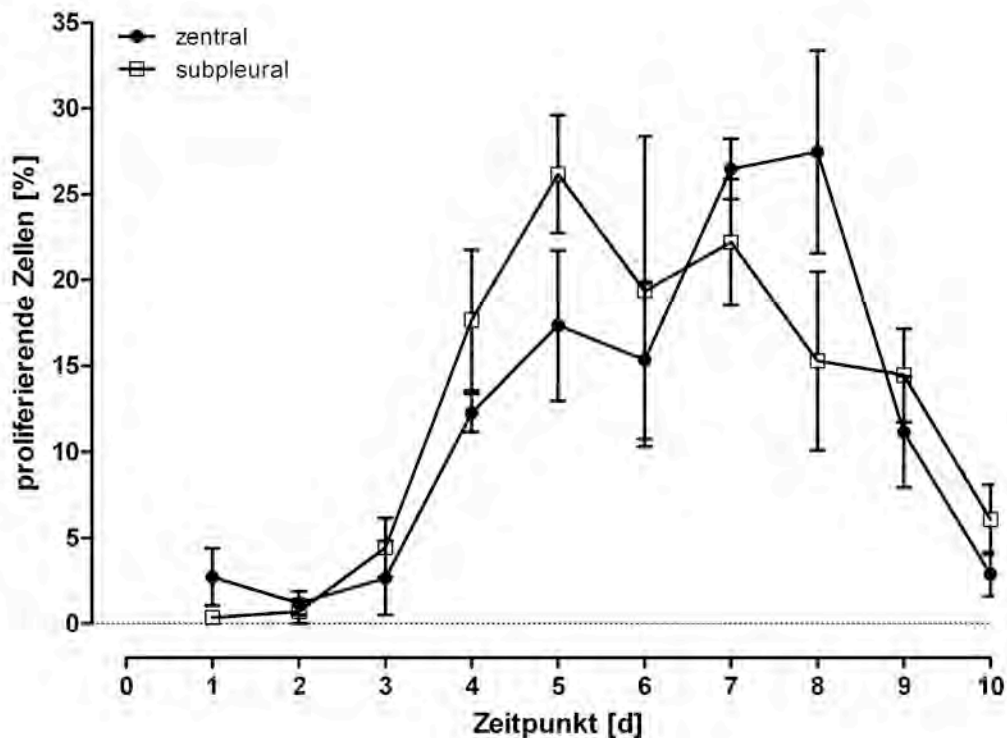


Abbildung 22: Postnatale regionale Proliferationsraten von AE2. Es zeigte sich eine Tendenz zu einer frühen subpleuralen und späten zentralen Proliferation der AE2. (MW \pm SEM; n=5)

3.3.2.1.3 Zentrale und subpleurale Proliferationsraten pPNX / Sham-Operation

Auch nach Pneumektomie proliferierten AE2 subpleural tendenziell früher als zentral. Während an Tag 4 pPNX zentral noch keine Mitosen detektierbar waren, konnte subpleural ein signifikant erhöhter Anteil von $12,96 \pm 2,84\%$ (MW \pm SEM) nachgewiesen werden. Weitere Messwerte unterschieden sich subpleural im Vergleich zu zentral statistisch nicht. Im Verlauf gipfelten die Teilungsraten zentral wie subpleural an Tag 6 pPNX und fielen bis Tag 8 pPNX auf ca. ein Drittel ihrer maximal erreichten Teilungsaktivität zurück (s.

Abbildung 23). Die Proliferationsraten zentral und subpleural nach Sham-Operation lagen jeweils bei 0%.

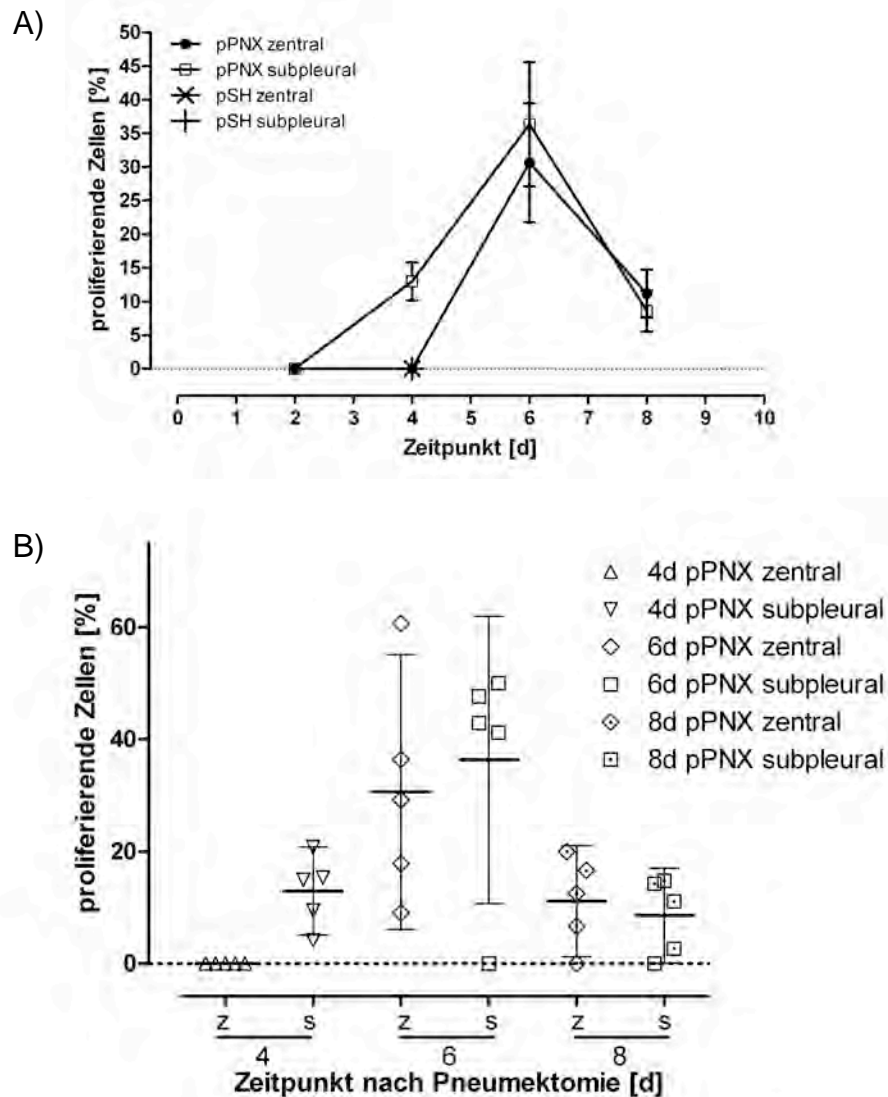


Abbildung 23: Zentrale und subpleurale AE2-Proliferationsraten nach PNx. A) Verlaufs-Graphik. (MW \pm SEM; n=5), B) *Scattered Dot Plot*. An Tag 4 pPNx stiegen die Zellteilungsrate subpleural bereits signifikant an. (MW; Fehlerbalken = 95%-Konfidenzintervall; n=5)

3.3.2.2 Myofibroblasten (MF)

3.3.2.2.1 Globale Proliferationsraten

Nach Geburt war der Anteil proliferierender Myofibroblasten bereits an P1 ($7,61 \pm 2,06\%$) und P2 ($5,95 \pm 1,93\%$) erhöht. Sie stiegen an P3 steil auf $14,66 \pm 3,46\%$ an. Nach einem Abfall an P6-7 bestand an P8 ein zweites Maximum, woraufhin die Proliferationen bis P10 wieder unter den Ausgangswert abfielen (s. Abbildung 24-C).

Nach Pneumektomie stiegen die MF-Zellteilungen erst ab dem vierten postoperativen Tag. Es zeigte sich ein Gipfel an Tag 6 pPNX mit anschließendem Abfall der Mitosen. Statistisch ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zeitpunkten nachweisen (s. Abbildung 24-B).

Im Vergleich zu den postnatalen Mitoseraten zeigte sich beim kompensatorischen Lungenwachstum die Tendenz zu einer kürzeren Episode erhöhter MF-Zellteilungen, die erst nach einem postoperativen Intervall von 4 Tagen einsetzte und früher endete als postnatal (8d pPNX – P8 $P < 0,01$; s. Abbildung 24-A).

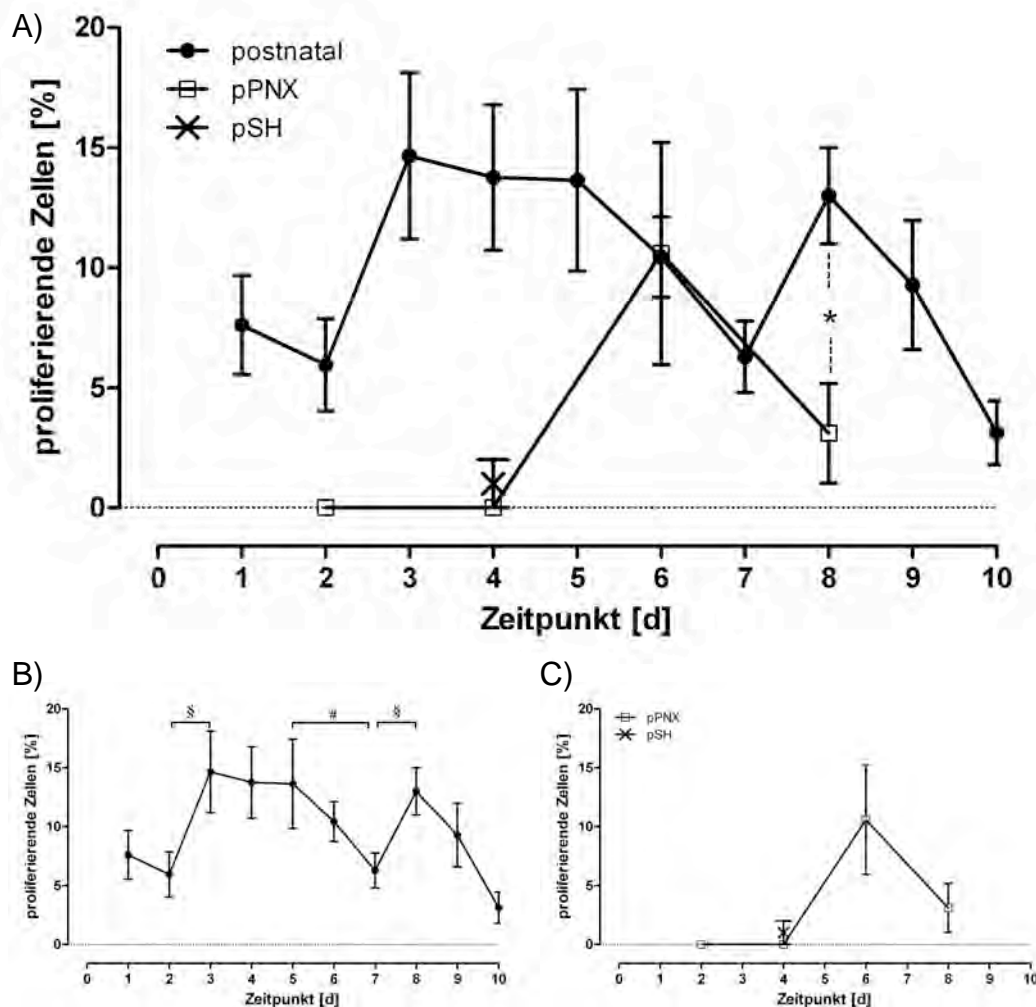


Abbildung 24: Globale Proliferationsraten der Myofibroblasten. **A)** postnatal und nach PNX / Sham-Operation, **B)** postnatal, **C)** nach PNX / Sham-Operation. Die Phase erhöhter Zellteilungs-Geschwindigkeit war verglichen zu den postnatalen Vorgängen verkürzt: sie begann später und endete früher. (MW \pm SEM; n=5; #: n.s.; §: P<0,05; *: P<0,01)

3.3.2.2 Postnatale zentrale und subpleurale Proliferationsraten

Die statistische Auswertung der nach Topologie aufgeteilten Proliferationsraten von MF lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Die hohen Standardfehler des Mittelwertes aus der Analyse der IF-Färbungen ließen - außer an P7 - keine statistisch belegbaren Unterschiede in der Mitoserate zentral bzw. subpleural erkennen.

Zentral zeigte sich an P4 ein Proliferations-Maximum mit $15,84 \pm 5,82\%$. Von P6 auf P7 fielen die Zellteilungen signifikant auf einen Anteil von $3,09 \pm$

0,85% ab und stiegen darauf bis P8 wieder auf $14,69 \pm 3,09\%$ an (s. Abbildung 25).

Subpleural war an P3 ein Maximum von $18,00 \pm 5,82\%$ zu verzeichnen, während der Abfall an P7 in diesem Areal nicht erkennbar war, so dass sich zentrale und subpleurale Messwerte zu diesem Zeitpunkt signifikant voneinander unterschieden.

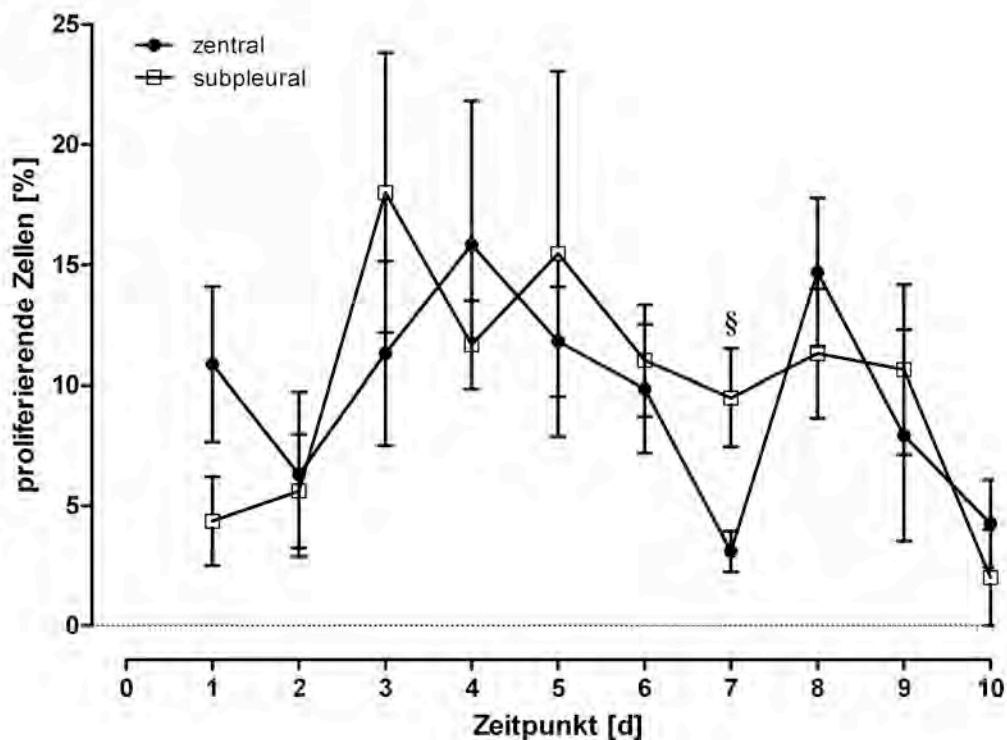


Abbildung 25: Zentrale und subpleurale MF-Zellteilungen in der postnatalen Alveolarisierung. Außer an P7 gab es keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverlauf zentraler und subpleuraler Areale. (MW \pm SEM; n=5; § : P<0,05)

3.3.2.2.3 Zentrale und subpleurale MF-Proliferationsraten nach PNX / Sham-Operation

Nach Pneumektomie begannen die MF erst nach Tag 4 pPNX mit der vermehrten Zellteilung (s. Abbildung 26). Zwischen zentralen und subpleuralen Zellteilungsrate konnte kein statistisch signifikanter

Unterschied beobachtet werden, sowohl im Verlauf als auch im Vergleich untereinander. Es zeigte sich jedoch die Tendenz zu höheren Proliferationsraten in zentralen Arealen.

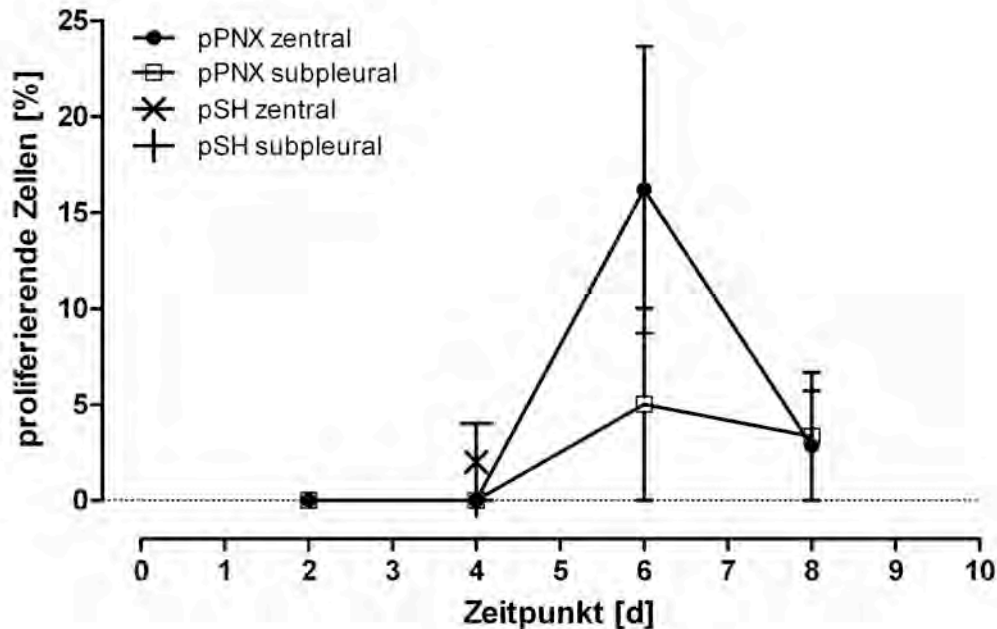


Abbildung 26: Zentrale und subpleurale MF-Zellteilungsrate nach Pneumektomie / Sham-Operation. (MW \pm SEM; n=5)

3.3.2.3 Bronchialepithelzellen (BE)

3.3.2.3.1 Globale Proliferationsraten

Im Vergleich zu den bisher dargestellten Zelltypen als auch zu den globalen Proliferationsraten fielen die bereits am ersten Tag nach Geburt stark erhöhten Werte des Bronchialepithels auf ($12,22 \pm 0,98\%$). Von P3 auf P4 stieg die Mitoserate signifikant auf $16,37 \pm 1,39\%$ an. Im Verlauf sank der Anteil wieder auf durchschnittlich 13% ab, fiel jedoch bis P10 nicht unter 11% (s. Abbildung 27-B).

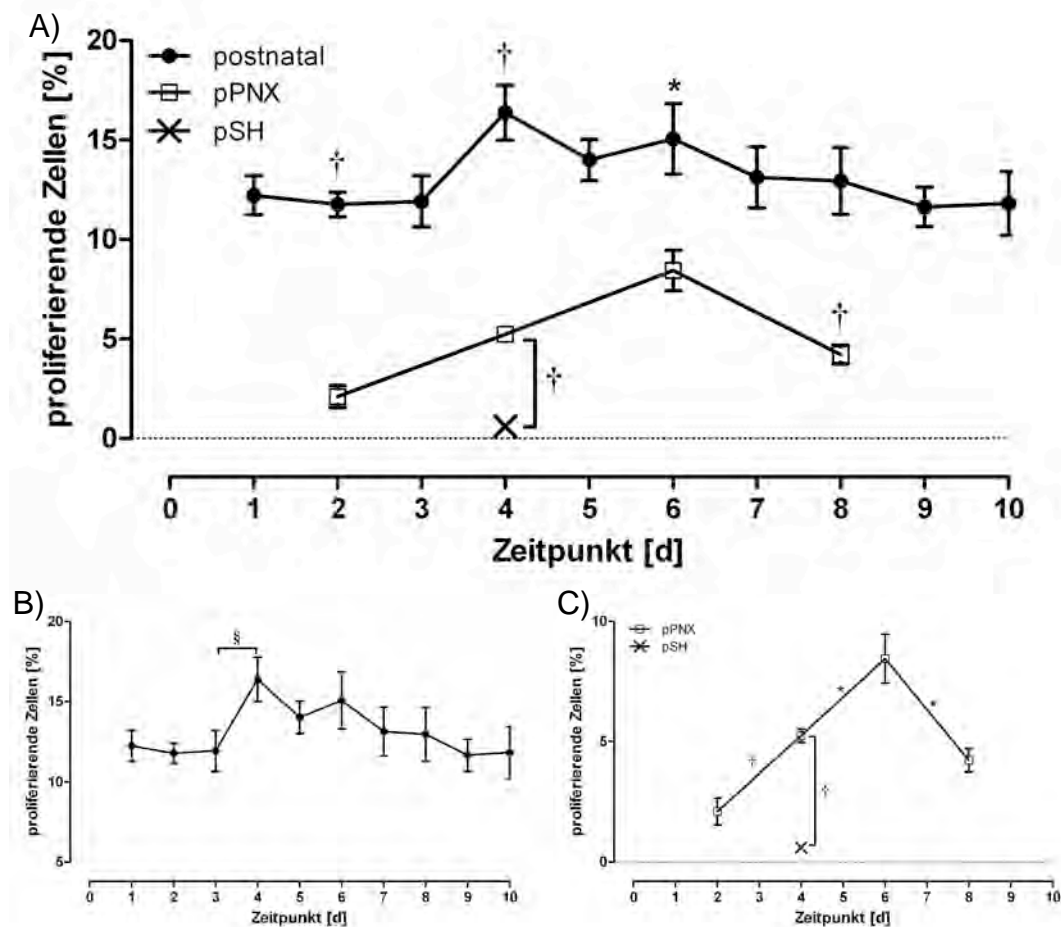


Abbildung 27: Globale Proliferationsraten des Bronchialepithels. A) postnatal und nach PNX / Sham-Operation, **B)** postnatal, **C)** nach PNX / Sham-Operation. Durchschnittliche und maximale Proliferationsraten waren postnatal signifikant höher als nach PNX. Während die Zellteilungen der BE in den ersten zehn postnatalen Tagen relativ konstante Werte aufwiesen, zeigte sich nach PNX ein Anstieg bis 6d pPNX gefolgt von einem signifikanten Abfall, der bis Tag 8 pPNX nicht auf die Basalrate zurückkehrte (MW \pm SEM; n=5; §: P<0,05; *: P<0,01; †: P<0,001).

Im Vergleich war das Ausmaß der durchschnittlichen und der maximalen BE-Proliferation nach Pneumektomie signifikant niedriger als beim postnatalen Lungenwachstum. Die Werte unterscheiden sich zu jedem untersuchten Zeitpunkt mit $P < 0,001$ (Ausnahme P6 – 6d pPNX $P < 0,01$). Nach Geburt bestand ein Maximum an P4 während die Zellteilungen nach PNX erst an Tag 6 gipfelten (s. Abbildung 27-A).

Nach Pneumektomie zeigte sich kein derart konstantes Proliferationsprofil: Bereits 2d pPNX waren die Werte mit $2,11 \pm 0,56\%$ signifikant erhöht. Der weitere Anstieg bis zu einem Maximum an Tag 6 pPNX mit $8,45 \pm 1,02\%$ war

ebenfalls signifikant. Zwischen allen Messwerten ließ sich ein statistischer Unterschied belegen (s. Abbildung 27-C).

3.3.2.3.2 Postnatale zentrale und subpleurale Proliferationsraten

Im Vergleich von zentralen und subpleuralen Arealen fiel nach Geburt eine Tendenz zu ausgeprägter Zellteilung in zentralen Abschnitten auf. Signifikante Unterschiede bestanden an P3 (zentral: $14,90 \pm 1,62\%$ vs. subpleural: $8,92 \pm 0,56\%$; MW \pm SEM; $P < 0,01$) und P9 (zentral: $14,03 \pm 0,99\%$ vs. subpleural: $9,26 \pm 0,74\%$; $P < 0,01$). In beiden Arealen der Lunge waren die Maxima an P4 zu verzeichnen (s. Abbildung 28).

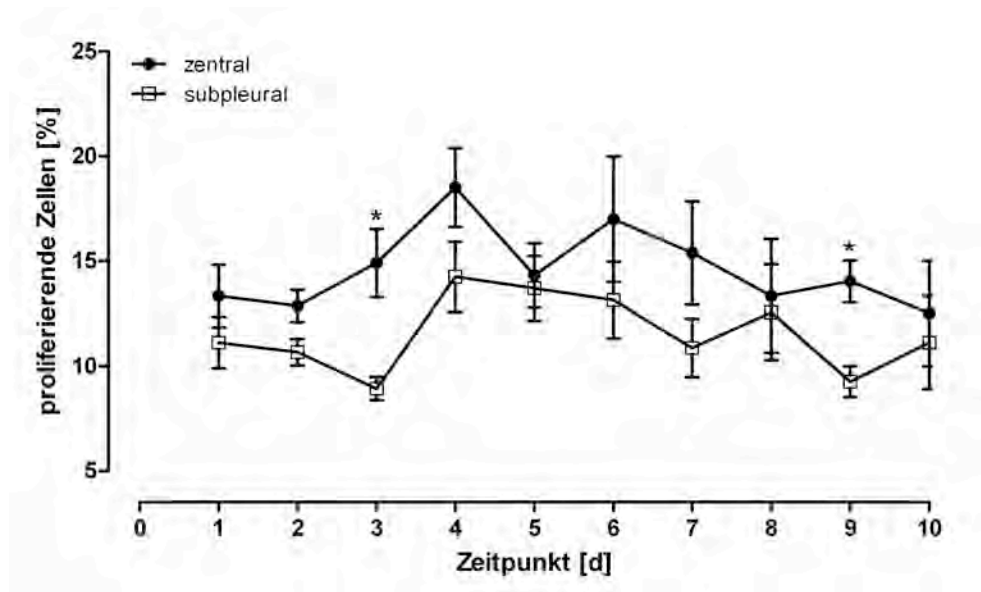


Abbildung 28: Zentrale und subpleurale BE-Proliferationsraten in der postnatalen Alveolarisierung. In beiden Gruppen fanden sich Maxima an P4. Es zeigte sich eine Tendenz zu erhöhten Proliferationsraten in zentralen Regionen, die an P3 und P9 Signifikanz-Niveau erreichte (MW \pm SEM; $n=5$; *: $P < 0,01$).

3.3.2.3.3 Zentrale und subpleurale BE-Proliferationsraten nach PNX / Sham-Operation

Auch beim kompensatorischen Lungenwachstum bestand eine Tendenz zu relativ höheren BE-Zellteilungsrate in zentralen Arealen der Lunge. Der Anteil proliferierender Zellen subpleural an Tag 2 pPNX unterschied sich nicht signifikant von der basalen Zellteilungsrate adulter Tiere, gemessen an den Werten 4 Tage nach Sham-Operation. Ab Tag 4 pPNX kam es subpleural zu einem stärkeren Anstieg der Mitoseraten, zentral hingegen

bereits an Tag 2 pPNX mit $3,39 \pm 0,63\%$ (MW \pm SEM; $P < 0,01$). Auch im weiteren Verlauf zeigte sich die Tendenz zu zentral höheren Proliferationsraten, die jedoch nur an Tag 8 pPNX ein weiteres Mal Signifikanz-Niveau erreichten. Die Maxima der Zellteilungen beider Areale bestanden jeweils an Tag 6 pPNX (s. Abbildung 29).

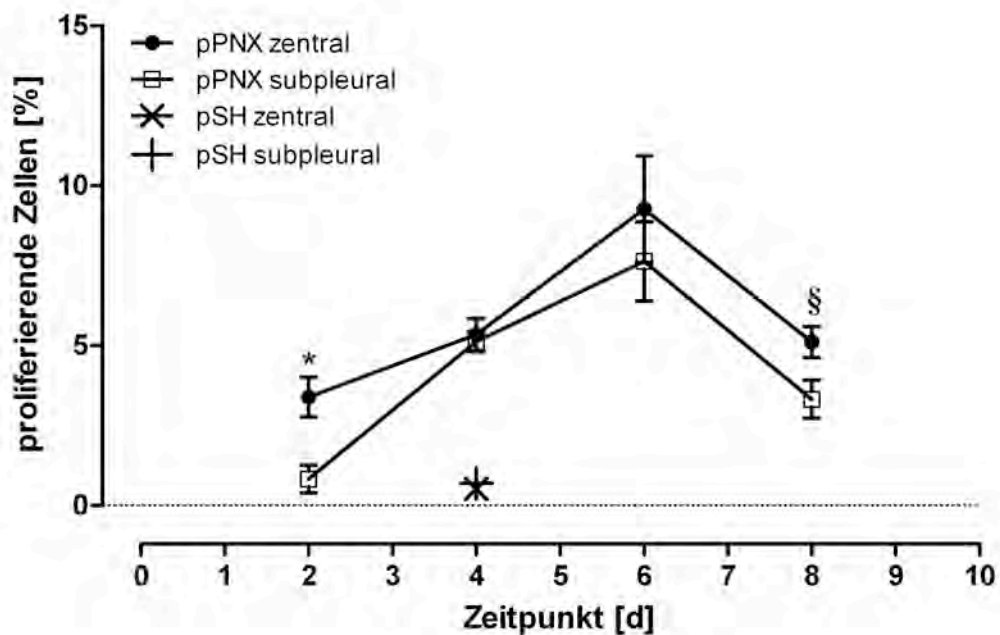


Abbildung 29: Zentrale und subpleurale BE-Zellteilungen nach Pneumektomie / Sham-Operation. Die Proliferations-Geschwindigkeit war zentral gegenüber subpleural tendenziell erhöht. Sie unterschieden sich an Tag 2 pPNX subpleural nicht signifikant von der Grundproliferation, gemessen an Tag 4 nach Sham-Operation. Daher ist von einem subpleural verzögert einsetzenden Anstieg der Mitoseraten auszugehen. (MW \pm SEM; $n=5$; § : $P<0,05$; * : $P<0,01$)

3.3.2.4 Vergleich der globalen Proliferationsraten aller untersuchter Zelltypen postnatal

In Abbildung 30 ist der postnatale Proliferationsverlauf der untersuchten Zelltypen dargestellt. Um die Übersichtlichkeit zu verbessern, sind lediglich die Mittelwerte für jeden Zeitpunkt aufgetragen.

An P1 und P2 proliferiert das BE mit signifikant höheren Raten als AE2 und MF. Bei der Aussprossung der sekundären Septen an P3 war der Anteil sich

teilender MF im Vergleich zu den restlichen Zellkompartimenten kurzfristig tendenziell am höchsten, unterschied sich jedoch nicht signifikant vom BE. AE2 lag zu diesem Zeitpunkt noch deutlich unter BE ($P < 0,001$). Die Teilungsraten von BE blieben im weiteren Verlauf bis P10 relativ konstant bei durchschnittlich 13%. MF proliferierten von P4 bis P10 weiterhin mit geringeren Raten als BE. Ab P3 nahm die Mitoserate der AE2 zu und überstieg die Werte der BE ab P5 signifikant. AE2 proliferierten in den nächsten drei Tagen konstant stärker als BE. Ab P8 lagen die Werte dieses Zelltyps wieder unter denen vom BE. AE2 boten mit maximal $24,33 \pm 2,05\%$ an P7 die höchste Proliferationsrate aller untersuchten Zelltypen.

Zusammengefasst ließ sich eine Initialphase (P1-2) erkennen, in der AE2 mit ca. 1% am geringsten, MF mit ca. 7% und BE mit ca. 12% am stärksten proliferierten. Die Zellteilungsraten der BE blieben bis P10 konstant. An P3 war kurzzeitig der Anteil sich teilender MF am größten. Von P5 bis P10 zeigten die MF wieder eine geringere Proliferationsaktivität als das BE. AE2 wiesen mit Abstand den größten Anteil proliferierender Zellen auf. Ab P9 fielen die Mitoseraten von MF und AE2 wieder auf Werte $< 5\%$ ab.

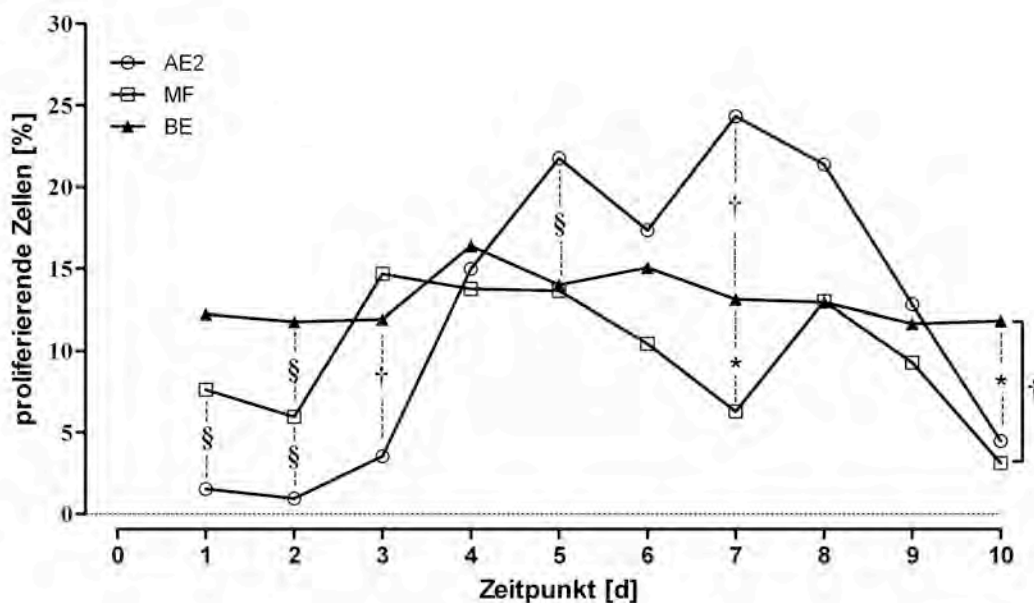


Abbildung 30: Postnatales globales Proliferationsverhalten aller untersuchten Zelltypen (MW; n=5; § : $P < 0,05$; * : $P < 0,01$; † : $P < 0,001$).

3.3.2.5 Vergleich der globalen Proliferationsraten aller untersuchter Zelltypen nach Pneumektomie / Sham-Operation

In Abbildung 31 sind die globalen Proliferationsverläufe der untersuchten Zelltypen nach Pneumektomie gegenübergestellt. Die Proliferationsrate von BE war auch im kompensatorischen Lungenwachstum bereits an Tag 2 pPNX auf $2,11 \pm 0,56\%$ erhöht, wohingegen in den restlichen Zelltypen keine Mitosen detektierbar waren. Bis Tag 4 pPNX stiegen die Teilungsraten von AE2 bereits steil an, während Mitosen von Myofibroblasten erst nach Tag 4 pPNX nachweisbar waren. Maxima der Teilungsraten waren bei allen Zelltypen am 6. postoperativen Tag zu erkennen, wobei AE2 mit $33,48 \pm 6,09\%$ den höchsten Anteil proliferierender Zellen aufwies. Bis Tag 8 pPNX fielen die Raten in allen untersuchten Zelltypen ab, erreichten den jeweiligen Ausgangswert jedoch nicht. Dies impliziert, dass die Phase erhöhter vermehrter Zellteilungen als Ausdruck des kompensatorischen Lungenwachstums in den untersuchten Zellkompartimenten nach den ersten acht postoperativen Tagen noch nicht abgeschlossen war.

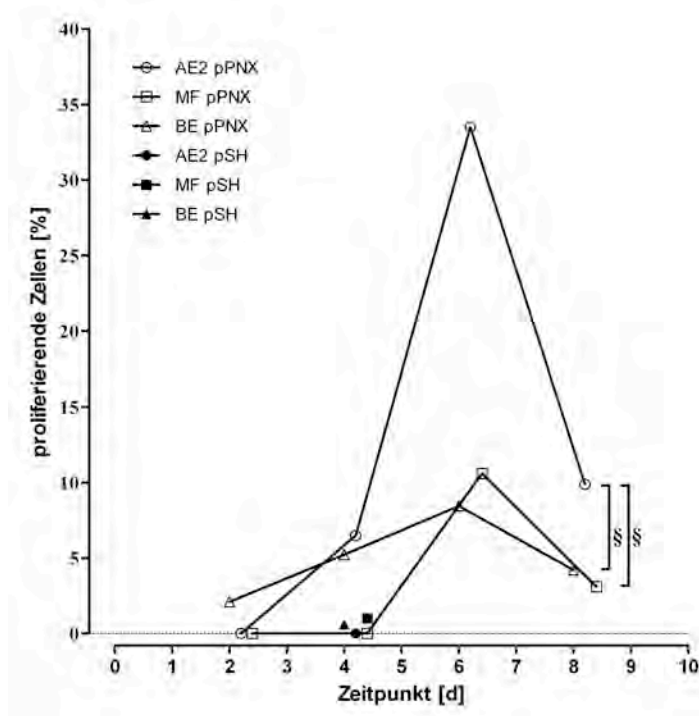


Abbildung 31: Globale Proliferationsverläufe im kompensatorischen Lungenwachstum. Im Sinne der Übersichtlichkeit wurden die SEM nicht aufgetragen. Um Überlappungen zu vermeiden wurden die Messwerte z. T. auf der Abszisse nach rechts verschoben dargestellt (MW; n=5; § : P<0,05).

4 Diskussion

Das postnatale Lungenwachstum wurde schon in diversen Spezies auf die zelluläre Proliferationskinetik und regulatorische Einflüsse hin untersucht (3–6, 8, 16, 25, 45, 56, 57, 78, 83, 93, 95). Dies gilt ebenfalls für das kompensatorische Lungenwachstum nach teilweisem Verlust von Lungengewebe (40, 49, 50, 59, 62, 90). Trotzdem sind die molekularen Mechanismen, welche das Wachstum initiieren und regulieren, sowohl postnatal (13, 61) als auch bei der kompensatorischen Alveolarisierung (35), bis heute weitgehend unklar.

Das in der vorgelegten Studie zur Anwendung kommende Modell des post-Pneumektomie-Lungenwachstums der Inzuchtmaus C57Bl6/J eignet sich gut für Untersuchungen zur Induktion und Regulation der Alveolarisierung im adulten Organismus sowie für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze. Die Maus könnte für die zukünftige Forschung einzigartige experimentelle Möglichkeiten auf genetischer Ebene mit hoher biologischer Aussagekraft bieten. Grundlage dafür ist allerdings die detaillierte Kenntnis der globalen sowie Zelltyp-spezifischen Proliferationskinetik im kompensatorischen und, vergleichend dazu, im postnatalen Lungenwachstum. In bisherigen Veröffentlichungen zu diesem Thema sind diesbezüglich kaum detaillierte Daten publiziert worden.

4.1 Bisherige Untersuchungsmethoden

Bisher erfolgte die qualitative und quantitative Bestimmung des Lungenwachstums durch die Messung des Lungenvolumens (3) durch Wasserverdrängung und des Lungengewichtes, wobei mittels einer Division durch das Körpergewicht diese Parameter oftmals normalisiert wurden (10, 66, 90). Während eine Zunahme des Lungengewichtes eine Zunahme der Zellmasse voraussetzt, lässt die Messung des Lungenvolumens keine Rückschlüsse darauf zu, ob es sich um proliferative Prozesse mit Zunahme der alveolären Zellmasse oder um die reine Expansion vorbestehender

Alveolen im Sinne eines Emphysems handelt. Morphometrische Daten zur Abschätzung der Alveolenzahl wurden bisher nach der Methode von *Weibel* und *Gomez* (92) erhoben und in den letzten Jahren weiterentwickelt. Ein kritischer Punkt bei der Untersuchung struktureller Abnormalitäten des Lungengewebes ist die Quantifizierung struktureller Veränderungen alveolärer Regionen. Weitverbreitete Methoden zur morphometrischen Analyse emphysematöser Lungen, wie beispielsweise die Berechnung des *mean linear intercept* (MLI, L_m), konnten zu irreführenden Resultaten führen, da sie die dreidimensionale Architektur des Organs und die inhomogene Verteilung der zu analysierenden Strukturen nicht berücksichtigten (44). Um die Unzulänglichkeiten dieser Methoden zu eliminieren, führten *Burri*, *Weibel* und *Gundersen* in den 1960-er Jahren die *design-based stereology* ein. Es wurden die grundlegenden Methoden der Lungenfixierung und Gewebeauswahl beschrieben, die sicherstellen, dass Proben, Schnitte und Gesichtsfelder repräsentativ für das gesamte Organ sind. Im Zentrum der *design-based stereology* stehen Testsysteme zur Analyse von Volumen, Oberfläche und Länge bestimmter Strukturen. Neue stereologische Instrumente, wie der *disector* (*di-sector* bezieht sich auf die Verwendung zweier physischer oder optischer Schnitte mit definiertem Abstand zueinander), erlauben die Schätzung der Anzahl und Größe von Zellen oder Strukturen (im Falle der Lungen beispielsweise Alveolen) ohne dabei auf Modellannahmen bezüglich der Form oder Orientierung der Zielstrukturen angewiesen zu sein. Die Anwendung weiterer Instrumente (z. B. *orientator*, *fractionator*) lösen Probleme mithilfe der Anisotropie (d. h. die ungleichmäßige interne Verteilung von Strukturen wie dem Bronchialsystem) und Gewebeschrumpfung während der Probenverarbeitung. *Design-based stereology* repräsentiert den Goldstandard für die Morphometrie biologischer Proben (44).

Die genannten Methoden charakterisieren den Zeitverlauf und das Ausmaß des Lungenwachstums und können postnatal sowie post-PNX angewendet werden. Klare Aussagen zu den Mitoseraten der Zelltypen werden hierdurch jedoch nicht gemacht.

Studien, in denen globale und Zelltyp-spezifische Proliferationsraten mittels Immunfluoreszenz-Färbungen erhoben wurden, sind rar. Bislang wurden die globalen Proliferationsraten anhand der Inkorporation von [³H]-Thymidin in die DNA (10) und die Bestimmung des totalen DNA-Gehaltes der Lunge erfasst. Die Beobachtung von Silberpartikel-Akkumulation im Interstitium nach Verabreichung von mit Silber angereichertem Trinkwasser und die mikroskopische Einteilung der Zelltypen nach Morphologie (60) ist ein weiteres quantifizierendes Verfahren. In neueren Arbeiten erhielt die Mitose-Detektion mittels Bromo-desoxyuridin (BrdU) bzw. Ki67-Markierung größere Bedeutung (90). Als weitere Möglichkeit der Färbung mitotischer Nuclei könnte eine H3P-Antikörperfärbung angesehen werden, die an das phosphorylierte Histonprotein H3 bindet. Nachteilig hierbei ist, dass für Ki67- und H3P-Färbungen spezielle Antigen-Demaskierungs-Methoden angewendet werden müssen, die die Antigen-Strukturen der verschiedenen Zelltypen weitgehend zerstören können.

Die Verwendung von Ki67- und H3P-Antikörperfärbungen in Kombination mit Zelltyp-spezifischen Färbungen stellte sich in der vorliegenden Studie aus oben genannten Gründen als schwer realisierbar dar und gelang nur auf Serienschnitten zufriedenstellend.

Die Etablierung des in der vorliegenden Arbeit angewandten PCNA-Färbeprotokolls (s. 2.2.8), das auf dem gleichen histologischen Schnitt eine zuverlässige und qualitativ hochwertige Doppel-Darstellung von PCNA und einem der Zelltypisierung dienlichen Molekül ermöglicht, ist deshalb ein großer Vorteil, der auch eine genauere Quantifizierung der Proliferation zulässt. Die bisher publizierten Daten zum Zeitverlauf globaler Proliferationsraten im postnatalen (3) und post-PNX-Lungenwachstum (10) konnten mit dieser Methode reproduziert und durch die Darstellung der Zelltyp-spezifischen Teilungsraten sowie deren Zeitverlauf ergänzt werden. Zudem konnte die hier vorliegende Studie eine Basis für weitere molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen der Regulations-Mechanismen der Alveolarisierung schaffen.

4.2 Vergleich der Lungenwachstumsmodi

Grundsätzlich verlaufen die postnatale und die post-Pneumektomie-Alveolarisierung bei verschiedenen Säugetierarten ähnlich. Unterschiede sind jedoch beim zeitlichen Ablauf der Proliferation sowie bei Geschlecht, Alter und hormonellem Status erkennbar (4, 6, 15, 24, 32, 39, 43, 82). Um geschlechts- und altersspezifische Einflussfaktoren in der Untersuchung des kompensatorischen Lungenwachstums zu minimieren, wurden nur die Lungen von Versuchstieren nach unilateraler Pneumektomie im Alter von acht Wochen in die Untersuchung einbezogen. Die in dieser Studie vorliegenden Daten beziehen sich postnatal sowie nach Pneumektomie auf gemischt-geschlechtliche Populationen.

4.2.1 Postnatale Lungenentwicklung

Die postnatale Lungenentwicklung wurde bereits in verschiedenen Arbeiten näher untersucht. Crocker et al. publizierten Daten zu der postnatalen Proliferation in Mäuselungen mittels Quantifizierung des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA. An P1 zeigten sich ca. 1% markierte Zellen, dann ein starker Anstieg bis P3 mit einem Gipfel an P4 (ca. 10%), gefolgt von einem Abfall ab P8 und einer Rückkehr des radioaktiv markierten Thymidgehaltes auf die Basalwerte an P14 (25). Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen der vorliegenden Studie. Die Zweigipfeligkeit (P5 / P8) des Proliferationsverlaufes in der aktuellen Studie ist aufgrund der nicht signifikanten Veränderung von P5 auf P7 statistisch nicht sicher belegt (s. 3.3.1.1). Die Daten werden durch verschiedene Publikationen verifiziert: In den ersten drei postnatalen Tagen expandieren die primären Sakkuli ohne erhebliche Proliferation, vielmehr durch Reorganisation und Dehnung ohne Hypertrophie oder Hyperplasie. Mit Beginn der Alveolarisierung durch Bildung sekundärer Septen ab P3/4 wird dann die Zellteilungs-Aktivität erhöht (3). Die Theorie von der großen Bedeutung der Myofibroblasten für das Auswachsen der sekundären Septen (89) wird durch die steigende Mitoseaktivität dieses Zelltyps an P3 gefestigt (s. 3.3.2.2.1). Auch in Rattenlungen wurde dies nachgewiesen (47). Durch

die Gewebeexpansion steigt der Bedarf an Typ I Alveolarepithelzellen, um die entstehenden definitiven Alveolen auszukleiden. Folglich steigen die Proliferationsraten ihrer Vorläuferzellen, der Typ II Alveolarepithelzellen (2), ab P4 an (s. 3.3.2.1.1). *Hind et al.* beschrieben bereits postnatal beständig erhöhte Mitoseraten im Bronchialepithel, führten jedoch keine quantitativen Analysen bezüglich der Proliferationskinetik dieses Zelltypen durch (38). In der vorliegenden Studie konnten diese Beobachtungen bestätigt und quantifiziert werden. Die Proliferationsrate des Bronchialepithels liegt im beobachteten Zeitraum konstant bei ca. 13% (s. 3.3.2.2.1). Eine Begründung dafür ist die Notwendigkeit der Verlängerung und Vergrößerung der luftleitenden Atemwege, die beim Größenwachstum der Gesamtlunge zu beobachten ist. Die Modifikation des Bronchialsystems scheint dabei besonders zentral stattzufinden (s. 3.3.2.3.2 / Abbildung 28). Diese Untersuchung berücksichtigte nicht die unterschiedlichen Zelltypen des Bronchialepithels der Maus (zilientragende Zellen, Becherzelle, Clara-Zellen, neuroendokrine Zellen, variante Clara-Zellen (73), da der primäre Fokus der Arbeitsgruppe auf dem alveolären Kompartiment liegt. Das Bronchialepithel wurde zum besseren Vergleich der alveolären Proliferationskinetik ebenfalls analysiert.

In der Ratte konnte gezeigt werden, dass Lungengewebe postnatal in subpleuralen Regionen schneller wächst als in zentralen (60). In der vorliegenden Studie konnte dies für die Maus statistisch nicht eindeutig nachgewiesen werden (s. 3.3.1.2).

4.2.2 Post-Pneumektomie Lungenwachstum

Nach Pneumektomie wies das verbleibende Lungengewebe der Versuchstiere ein kompensatorisches Wachstum durch schnelle Zunahme der Zellteilungsraten auf. Die globale Proliferationsrate stieg erst ab Tag 4 pPNX an, gipfelte an Tag 6 und kehrte bis Tag 8 pPNX nicht auf die basalen Teilungsraten der Sham-operierten Kontrollen zurück (s. Abbildung 16). Das Wachstum ließ sich subpleural und zentral statistisch nicht unterscheiden (s. Abbildung 15). Typ II Alveolarepithelzellen zeigten mit einem Anteil von ca.

35% mitotischer Zellen nach PNX die ausgeprägteste Zellvermehrung (s. Abbildung 31).

Global war die Proliferationsaktivität postnatal höher und länger anhaltend als nach unilateraler Pneumektomie (s. Abbildung 18).

Die globalen Proliferationsraten bei der Alveolarisierung nach Pneumektomie bestätigen ebenfalls die bisher veröffentlichte Literatur. *Brody et al.* publizierten Daten zur Proliferation in der Rattenlunge (10). Das Lungenvolumen stieg 2 Tage pPNX rapide an, und die Proliferationsraten nahmen an Tag 2 und 3 pPNX stark zu. Eine signifikante Steigerung der DNA-Synthese war an Tag 3 pPNX messbar und erreichte an Tag 6 pPNX ein Maximum (12). Die Mäuselunge zeigte in den hier vorliegenden Untersuchungen einen vergleichbaren Proliferationsverlauf. Bei der Maus liessen sich histologisch noch 21 Tage nach Pneumektomie vereinzelt immature Alveolarsepten in subpleuralen Regionen nachweisen (66, 90). Diese wurden als Ausdruck vermehrter Mitoseaktivität und somit eines länger andauernden Wachstums in der Peripherie gedeutet. Die Daten der aktuellen Studie zeigten keinen signifikanten Unterschied der Zellproliferation in subpleuralen und zentralen Arealen. Dieser Befund wäre im Konflikt mit der bis vor kurzem gängigen These der präferentiellen Alveolarisierung an Grenzflächen (Pleura, größere Bronchien und Gefäße) aufgrund der dort teils fortbestehenden doppelten Kapillarschichten. Diese These wurde jedoch kürzlich von *Schittny et al.* durch dreidimensionale Rekonstruktion einzelner Alveolen, welche die Neoalveolarisierung auch aus Septen mit einschichtigen Kapillaren zeigten, widerlegt (79). Somit spiegeln die hier erhobenen Proliferationsdaten eine eher homogene Expansion / Neoalveolarisierung nach Pneumektomie wieder.

Sowohl globale als auch Zelltyp-spezifische Proliferationsraten unterscheiden sich im postnatalen Lungenwachstum wesentlich von denen in der Alveolarisierung nach Pneumektomie. Postnatal liegen die Werte zu jedem Zeitpunkt höher als pPNX. Während nach der Geburt verschiedene Phasen abgrenzbar sind, in denen die Proliferationsraten in einem bestimmten Zelltyp dominieren (s. Abbildung 30), gipfelt die Mitoseaktivität nach

Pneumektomie generell am sechsten postoperativen Tag (s. Abbildung 31). Diese Beobachtung legt nahe, dass Stimuli, die nach der Geburt in einer bestimmten Chronologie ablaufen und einander ggf. induzieren, nach Verlust von Lungengewebe möglicherweise nicht mehr nacheinander, sondern gleichzeitig im verbleibenden Lungengewebe aktiv sind. Auffällig ist dabei die überschießende Proliferationsaktivität der Typ II Alveolarepithelzellen (ca. 35%, s. Abbildung 21), welche wahrscheinlich ein Zeichen für die massive Expansion der alveolären Oberfläche ist. Dieses Phänomen könnte in zukünftigen Studien mit der Vermehrung bzw. der Proliferationskinetik von aus Typ II Zellen entstehenden Typ I Alveolarepithelzellen korreliert werden. Bisher ist deren Darstellung mittels Immunfluoreszenz nur erschwert möglich. Besonders die Quantifizierung stellt aufgrund der Zellmorphologie ein Problem dar. Für die exakte Quantifizierung der Proliferation ist die Zuordnung eines Zellkerns zu der dazugehörigen Zelle essentiell. Die Entwicklung von transgenen Tieren, deren Typ I Alveolarepithelzellen GFP exprimieren, und die Verwendung der hochauflösenden konfokalen Lasermikroskopie wäre somit für zukünftige Studien von Interesse. Vorteil der Anwendung konfokaler Schichtaufnahmen mit hoher Ortsauflösung wäre den sehr dünnen Zytoplasmasaum der Typ I Zellen, und somit deren Zellgrenzen, darzustellen.

4.3 Aspekte für die zukünftige Forschung

In Bezug auf weitere Subpopulationen pulmonaler Zellen wäre zukünftig die Proliferationskinetik der bereits erwähnten **Lipofibroblasten** (s. 1.1.4 / 3.2) von großer Bedeutung. Diese sind am Aussprossungsort der sekundären Septen („*secondary crests*“) und deren auswachsenden Grate angesiedelt und werden in der aktuellen Literatur mit Alveolarisierungs-Prozessen in Verbindung gebracht (81). Die Darstellung der für Lipofibroblasten charakteristischen zytoplasmatischen Lipidvakuolen gelang mit einem Antikörper gegen das *Adipocyte Differentiation-Related Protein* (ADFP), welches als amphiphiles Protein die Lipide umhüllt. Lipofibroblasten wurden im Lungengewebe von Mäusen fünf Tage nach Geburt detektiert. Die diffuse Verteilung der Lipidtröpfchen im Zytoplasma erschwert die Zuordnung von

Zellgrenzen und damit die genaue Quantifizierung erheblich (s. Abbildung 12). Um die Zytoplasmagrenzen besser darstellen zu können, wurde die ADFP-Färbung durch eine simultane Färbung der extrazellulären Matrix mit einem Lectin ergänzt (s. Abbildung 13). Mittels Anfertigung optischer Schichtaufnahmen 10µm dicker Paraffinschnitte mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop wäre es möglich, dem einzelnen Lipofibroblasten den zugehörigen Zellkern zuzuordnen und eine Quantifizierung vorzunehmen. Die gleichzeitige Färbung von ADFP, Lectin und dem Proliferationsmarker PCNA konnte bislang nicht hinreichend etabliert werden.

Ein weiterer Zelltyp, der am Lungenwachstum beteiligt ist und daher zukünftig einer genauen Untersuchung bedarf, sind die so genannten **Bronchoalveolären Stammzellen (BASCs)**. BASCs exprimieren sowohl das Clara-Zell-spezifische Protein *Clara-Cell-Secretory-Protein* (CCSP) als auch das Typ II Alveolarepithelzell-spezifische *Pro-Surfactant-Protein-C* (SPC). Diese Subpopulation der Clara-Zellen gilt als multipotente Stammzellen des bronchiolo-alveolären Epithels und ist vermutlich an der Regeneration von Lungengewebe nach bronchialem und alveolärem Zellverlust beteiligt (51). Der Beitrag von BASCs zur Regeneration bzw. Reparatur des alveolären Kompartimentes ist umstritten (74). Die Zellen sind typischerweise an der „Bronchoalveolären *Duct Junction*“ (dem Übergang der Bronchioli terminales in die Ductus alveolares) lokalisiert (51). Inwiefern dieser Zelltyp am kompensatorischen Lungenwachstum beteiligt ist, bleibt bislang unklar.

Einen weiteren maßgeblichen Aspekt für die zukünftige Forschung stellt die Verwendung **transgener Tiermodelle** dar, in denen sich einzelne Zelltypen spezifisch manipulieren lassen. So lassen sich Rückschlüsse auf die jeweiligen spezifischen molekular-mechanistischen Beiträge bestimmter Zellpopulationen im Rahmen der Lungenentwicklung *in vivo* darstellen.

In transgenen Tiermodellen sind bereits verschiedene genetische Alterationsmöglichkeiten etabliert. Gene von Interesse können überexprimiert werden um anhand des neu entstandenen Phänotyps den dadurch resultierenden

Funktionszuwachs *in vivo* zu evaluieren (*Gain-of-function*). Die Herstellung der transgenen Tiere erfolgt hierbei bevorzugt durch die Pronucleus Methode (99) und mithilfe embryonaler Stammzellen (100). Bei ersterer Methode wird einer befruchteten Zygote *ex vivo* Fremd-DNA injiziert, die dann fest in die DNA des Individuums integriert wird. Bei Zweiterer wird Fremd-DNA in embryonale Stammzellkulturen transfiziert, was eine Positiv- bzw. Negativselektion vor Injektion der Stammzellen in eine Empfängerblastozyste ermöglicht.

Weiterhin ist die Deletion bestimmter Gene eine gängige Methode (*Loss-of function, Knock-out*) ihre Beiträge zur Funktion oder Entwicklung von Organen zu erforschen. In Kombination mit der Integration von Reportergenen (101), die beispielsweise für fluoreszierende Proteine kodieren, wurde zusätzlich die Lokalisation von Genexpression *in vivo* ermöglicht.

Unter der Expressionssystemen gibt es grundsätzlich schaltbare, zu einem bestimmten Zeitpunkt aktivierbare Systeme (konditionale Systeme) und dauerhaft exprimierende, nicht steuerbare Systeme (konstitutive Systeme). Konditionale Systeme arbeiten beispielsweise mit Tetrazyklin-aktivierbarem Tetrazyklintransaktivator (tTA; tet-off System) oder reversem tTA (tet-on System). Bei tet-off Systemen ist die Genexpression in Abwesenheit von Tetrazyklin angeschaltet, bei tet-on Systemen hingegen in Anwesenheit von Tetrazyklin aktiviert (102). Ein weiteres System bedient sich der cre-Rekombinase, einem viralen Protein (DNA-Restriktionsendonuklease und Ligase), das an sogenannten loxP-Stellen DNA schneidet. Die zwischen zwei loxP-Loci befindliche Sequenz wird dabei entfernt und die verbleibenden Enden folgend zusammenfügt (103).

In der bisherigen Forschung sind bereits diverse transgene Tierreihen beschrieben bei denen einzelne Zelltypen der Lunge mithilfe o. g. Methoden gezielt in ihrer Funktion beeinflusst werden können. Es wurden beispielsweise Typ II Alveolarepithelzellen mit SPC-Promotor gesteuerter Doxyzyklin-induzierbarer Expression von Genen des Interesses entwickelt

(SPC-rtTA, sogenanntes tet-on System)(104). Ebenso sind von Clarazellen durch CCSP-Promotor, sowie von Myofibroblasten durch *Smooth Muscle Myosin Heavy Chain* (SMMHC)-Promotor gesteuerte Expressionssysteme beschrieben. Fibroblastenvorläuferzellen der Lunge wurden mit PDGFR-alpha Promotor gesteuerten Expressionssystemen untersucht (7).

Im Rahmen der zukünftigen Forschung bieten transgene Tiermodelle eine hohes Potenzial den Anteil spezifischer Zellpopulationen bzw. Gene an der Lungenentwicklung speziell in Hinsicht auf funktionelle Aspekte *in vivo* zu erforschen.

4.4 Das kompensatorische Lungenwachstum bei Menschen

Für den Menschen ist kompensatorisches Lungenwachstum nur bedingt nachgewiesen. Eine Studie von *Laros et al.* zeigte, dass Kinder, die im Alter von 0 bis 5 Jahren eine Lungenteilresektion erfuhren, im Verlauf eine normale Lungenfunktion aufwiesen. Ursache dafür war die teilweise Regeneration von Lungengewebe durch Hyperplasie und alveoläre Multiplikation (67). Fand die Pneumektomie im Alter von 6 bis 20 Jahren statt, so verminderte sich die resultierende Lungenfunktion. Das kompensatorische Lungenwachstum erfolgte mit steigendem Alter weniger durch Hyperplasie, als vielmehr durch Hypertrophie der Zellen. Resektionen von Lungengewebe resultierten nach dem 20. Lebensjahr langfristig immer noch in einer guten Lungenfunktion, führten jedoch nicht mehr zu kompensatorischem Lungenwachstum, sondern zu einer Dilatation der verbleibenden Lungenanteile (53).

Unsere Untersuchungen zeigen, dass das Modell des kompensatorischen Lungenwachstums in der C57Bl6/J-Maus nach unilateraler Pneumektomie auch für die zukünftige Forschung geeignet ist. Hiermit ist es möglich, notwendige und gut reproduzierbare Ergebnisse zur weiterführenden Untersuchung der Mechanismen zu erbringen, die an der Generierung von pulmonaler Gasaustauschoberfläche in adulten Säugetieren beteiligt sind (58). In Verbindung mit dem detaillierten Wissen um die physiologischen

postnatalen Vorgänge in der Lunge bilden diese Ergebnisse eine Grundlage, um neue Therapieansätze zur Induktion und Regulation der Neoalveolarisierung beim erwachsenen Menschen zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Das Tiermodell des kompensatorischen Lungenwachstums nach unilateraler Pneumektomie stellt eine Möglichkeit dar, die bisher weitgehend unverstandenen Regulationsmechanismen der Neoalveolarisierung näher zu untersuchen mit dem Ziel der Entwicklung neuartiger, regenerativer therapeutischer Strategien für destruierende Lungenerkrankungen. Es wurde das postnatale Lungenwachstums mit der kompensatorischen Neo-Alveolarisierung nach linksseitiger Pneumektomie in der C57Bl6/J-Maus verglichen.

Kompensatorisches Lungenwachstum ist bereits in verschiedenen Säugetierspezies nachgewiesen worden.

In der vorliegenden Studie wurden mittels Mikroskop-gestützter Quantifizierung immunhistologischer Färbungen globale sowie Zelltyp-spezifische Proliferationsraten von Typ II Alveolarepithelzellen, Bronchialepithelzellen und alveolären Myofibroblasten untersucht.

Nach Geburt war eine transiente Phase global erhöhter, homogen über die Lunge verteilter Zellteilungsrate von P3 bis P8 erkennbar. Von P1 bis P2 war die Teilungsrate des Bronchialepithels am höchsten und blieb im Verlauf konstant erhöht (ca. 13%). Mit Beginn der Aussprossung sekundärer Septen ab P3 dominierte kurzfristig die Teilungsaktivität der Myofibroblasten. Von P5 bis P8 überwog die Mitoserate der Typ II Alveolarepithelzellen. Bis P10 fiel die Mitose der Typ II Alveolarepithelzellen und die der Myofibroblasten wieder ab.

Nach Pneumektomie stieg die globale Proliferationsrate erst ab Tag 4 an. Die Mitoseaktivität war homogen über die Lunge verteilt. An Tag 6 zeigte sich ein Maximum mit sehr hohen Proliferationsraten der Alveolarepithelzellen; bis Tag 8 wurde die basale Proliferationsrate der Sham-operierten Kontrolltiere nicht wieder erreicht. Die Teilungsaktivität der verschiedenen Zelltypen war jeweils an Tag 6 am höchsten.

Global war die Proliferationsaktivität postnatal höher (\emptyset 8,5%) als nach unilateraler Pneumektomie (\emptyset 3,5%). Die Proliferationsraten subpleuraler

und zentraler Areale unterschieden sich in beiden Lungenwachstumsmodi nicht signifikant.

Es konnte in der vorgelegten Studie, als Grundlage für die zukünftige Forschung, gezeigt werden, wie sich die Proliferationskinetik der postnatalen Lungenentwicklung von der der Alveolarisierung nach unilateraler Pneumektomie bei adulten Säugetieren unterscheidet.

6 Summary

Induced compensatory growth of the lung after left-sided pneumonectomy in mice represents a suitable model to study induction and regulation of neo-alveolarization in adult mammals. Post-pneumonectomy lung growth has already been described in different mammalian species but the intrinsic programs that control it still remain unclear.

This study focuses on the comparison of postnatal and post-pneumonectomy lung growth of the wildtype C57BL6/J mouse. The kinetics and time course of global and celltype-specific proliferation for both lung growth processes were assessed by quantification of proliferation-rates, based on immunohistological stainings. Studied cell-types comprised type II alveolar epithelial cells, bronchial epithelial cells and alveolar myofibroblasts.

In the postnatal lung growth from day three after birth (P3) to P8 the global proliferation-rate was elevated in the whole lung with homogeneous distribution. From P1 to P2 the bronchial epithelial cell proliferation showed the highest rates and remained elevated (approx. 13%) throughout the observed interval. With the onset of secondary septation on P3 mitosis-rates of the myofibroblasts dominated for a short period. From P5 to P8 cell divisions of the type II alveolar epithelial cells were preponderant. Mitotic activity of type II alveolar epithelial cells and myofibroblasts declined until P10.

Following pneumonectomy, the global proliferation-rate did not increase until day four after operation (4d pPNX). Mitotic activity was distributed evenly throughout the lung. There was a peak at day 6 pPNX and mitosis-rates did not return to the baseline values of sham-operated control animals by day 8. Proliferation-rates of all investigated cell-types showed maxima on day 6 pPNX. The global cell division rates were higher in postnatal lung growth (\emptyset approx. 8,5%) than in post-pneumonectomy-alveolarization (\emptyset approx. 3,5%). There was no significant difference between proliferation rates of subpleural and central lung regions in both models.

This study provides a basis for future research. It illustrated the differences in proliferation-kinetics of postnatal lung growth and compensatory alveolarization following partial pneumonectomy in adult mammals.

7 Literaturverzeichnis

- 1) **ad hoc Statement Committee, American Thoracic Society.** Mechanisms and limits of induced postnatal lung growth. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(3):319–43. Internet: doi:10.1164/rccm.200209-1062ST.
- 2) **Adamson IY, Bowden DH.** Derivation of type 1 epithelium from type 2 cells in the developing rat lung. *Lab. Invest.* 1975;32(6):736–45.
- 3) **Amy RW, Bowes D, Burri PH, et al.** Postnatal growth of the mouse lung. *J Anat* 1977;124(Pt 1):131–51.
- 4) **Bartlett D.** Postnatal growth of the mammalian lung: influence of exercise and thyroid activity. *Respiration physiology* 1970;9(1):50–7.
- 5) **Bartlett D.** Postnatal growth of the mammalian lung: influence of low and high oxygen tensions. *Respiration physiology* 1970;9(1):58–64.
- 6) **Bartlett D.** Postnatal growth of the mammalian lung: influence of excess growth hormone. *Respiration physiology* 1972;12(3):297–304.
- 7) **Boström H, Willetts K, Pekny M, et al.** PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* 1996;85(6):863–73.
- 8) **Boucherat O, Franco-Montoya M, Thibault C, et al.** Gene expression profiling in lung fibroblasts reveals new players in alveolarization. *Physiol Genomics* 2007;32(1):128–41. Internet: doi:10.1152/physiolgenomics.00108.2007.
- 9) **Breitbach C.** Zur mikroskopischen Anatomie der Lunge bei Ratte, Maus, Meerschweinchen und Kaninchen. Eine vergleichende Literaturstudie *Dissertation.* München: Ludwig Maximilians Universität; 1987.
- 10) **Brody JS.** Time course of and stimuli to compensatory growth of the lung after pneumonectomy. *J Clin Invest* 1975;56(4):897–904. Internet: doi:10.1172/JCI108169.

- 11) **Brody JS, Buhain WJ.** Hormonal influence on post-pneumectomy lung growth in the rat. *Respiration physiology* 1974;19(3):344–55.
- 12) **Brody JS, Burki R, Kaplan N.** Deoxyribonucleic acid synthesis in lung cells during compensatory lung growth after pneumectomy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1978;117(2):307–16.
- 13) **Brody JS, Williams MC.** Pulmonary alveolar epithelial cell differentiation. *Annu. Rev. Physiol.* 1992;54:351–71. Internet: doi:10.1146/annurev.ph.54.030192.002031.
- 14) **Brown LM, Malkinson AM, Rannels DE, et al.** Compensatory lung growth after partial pneumectomy enhances lung tumorigenesis induced by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res* 1999;59(20):5089–92.
- 15) **Brown LM, Rannels SR, Rannels DE.** Implications of post-pneumectomy compensatory lung growth in pulmonary physiology and disease. *Respir Res* 2001;2(6):340–7.
- 16) **Bruce MC, Lo PY.** A morphometric quantitation of developmental changes in elastic fibers in rat lung parenchyma: variability with lung region and postnatal age. *J. Lab. Clin. Med.* 1991;117(3):226–33.
- 17) **Burri PH.** The postnatal growth of the rat lung. 3. Morphology. *Anat. Rec.* 1974;180(1):77–98. Internet: doi:10.1002/ar.1091800109.
- 18) **Burri PH.** Postnatal growth and maturation of the lung. *Chest* 1975;67(2 Suppl):2S-3S.
- 19) **Burri PH, Dbaly J, Weibel ER.** The postnatal growth of the rat lung. I. Morphometry. *Anat. Rec.* 1974;178(4):711–30. Internet: doi:10.1002/ar.1091780405.
- 20) **Burri PH.** Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol. Neonate* 2006;89(4):313–22. Internet: doi:10.1159/000092868.
- 21) **Cagle PT, Langston C, Thurlbeck WM.** The effect of age on postpneumectomy growth in rabbits. *Pediatr Pulmonol* 1988;5(2):92–5.

-
- 22) **Cagle PT, Thurlbeck WM.** Postpneumectomy compensatory lung growth. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989;138(5):1314–26.
- 23) **Chess PR, Toia L, Finkelstein JN.** Mechanical strain-induced proliferation and signaling in pulmonary epithelial H441 cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000;279(1):L43-51.
- 24) **Cohn R.** Factors affecting the postnatal growth of the lung. *Anat. Rec.* (75):195–205.
- 25) **Crocker TT, Teeter A, Nielsen B.** Postnatal cellular proliferation in mouse and hamster lung. *Cancer Res* 1970;30(2):357–61.
- 26) **Davies G, Reid L.** Growth of the alveoli and pulmonary arteries in childhood. *Thorax* 1971;25(6):669–81.
- 27) **Dickie R, Wang YT, Butler JP, et al.** Distribution and quantity of contractile tissue in postnatal development of rat alveolar interstitium. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 2008;291(1):83–93. Internet: doi:10.1002/ar.20622.
- 28) **Emery JL, Mithal A.** The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch. Dis. Child.* 1961;35:544–7.
- 29) **Fernandez LG, Le Cras TD, Ruiz M, et al.** Differential vascular growth in postpneumectomy compensatory lung growth. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133(2):309–16. Internet: doi:10.1016/j.jtcvs.2006.09.003.
- 30) **Fernandez LG, Mehta CK, Kron IL, et al.** Reinitiation of compensatory lung growth after subsequent lung resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;134(5):1300–5. Internet: doi:10.1016/j.jtcvs.2007.07.005.
- 31) **Fisher JM, Simnett JD.** Morphogenetic and proliferative changes in the regenerating lung of the rat. *Anat. Rec.* 1973;176(4):389–95. Internet: doi:10.1002/ar.1091760403.
- 32) **Foster DJ, Yan X, Bellotto DJ, et al.** Expression of epidermal growth factor and surfactant proteins during postnatal and compensatory lung

- growth. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2002;283(5):L981-90. Internet: doi:10.1152/ajplung.00053.2002.
- 33) **Fritsch, Kühnel.** Taschenatlas der Anatomie in 3 Bänden, Band 2. Innere Organe: *Thieme*; 2003.
- 34) **Gilbert KA, Rannels DE.** Increased lung inflation induces gene expression after pneumonectomy. *Am J Physiol* 1998;275(1 Pt 1):L21-9.
- 35) **Gilbert KA, Rannels DE.** From Limbs to Lungs: A New Perspective on Compensatory Lung Growth. *News Physiol. Sci.* 2001;14:260–7.
- 36) **Haworth SG, McKenzie SA, Fitzpatrick ML.** Alveolar development after ligation of left pulmonary artery in newborn pig: clinical relevance to unilateral pulmonary artery. *Thorax* 1981;36(12):938–43.
- 37) **Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, et al.** Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 1997;106(6):348–60.
- 38) **Hind M, Corcoran J, Maden M.** Alveolar proliferation, retinoid synthesizing enzymes, and endogenous retinoids in the postnatal mouse lung. Different roles for Aldh-1 and Raldh-2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26(1):67–73.
- 39) **Holmes C, Thurlbeck WM.** Normal lung growth and response after pneumonectomy in rats at various ages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1979;120(5):1125–36.
- 40) **Hsia CC, Herazo LF, Fryder-Doffey F, et al.** Compensatory lung growth occurs in adult dogs after right pneumonectomy. *J Clin Invest* 1994;94(1):405–12. Internet: doi:10.1172/JCI117337.
- 41) **Hsia CC, Wu EY, Wagner E, et al.** Preventing mediastinal shift after pneumonectomy impairs regenerative alveolar tissue growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(5):L1279-87.

-
- 42) **Hsia CC, Zhou XS, Bellotto DJ, et al.** Regenerative growth of respiratory bronchioles in dogs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000;279(1):L136-42.
- 43) **Hsia CC.** Signals and mechanisms of compensatory lung growth. *J Appl Physiol* 2004;97(5):1992–8. Internet: doi:10.1152/japplphysiol.00530.2004.
- 44) **Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M, et al.** An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010;181(4):394–418. Internet: doi:10.1164/rccm.200809-1522ST.
- 45) **Huang K, Rabold R, Schofield B, et al.** Age-dependent changes of airway and lung parenchyma in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* 2007;102(1):200–6. Internet: doi:10.1152/japplphysiol.00400.2006.
- 46) **Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO.** Histologie: Springer-Verlag GmbH & Co. KG; 2002.
- 47) **Kauffman SL.** Cell proliferation in the mammalian lung. *International review of experimental pathology* 1980;22:131–91.
- 48) **Kauffman SL, Burri PH, Weibel ER.** The postnatal growth of the rat lung. II. Autoradiography. *Anat. Rec.* 1974;180(1):63–76. Internet: doi:10.1002/ar.1091800108.
- 49) **Kaza AK, Cope JT, Fiser SM, et al.** Contrasting natures of lung growth after transplantation and lobectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123(2):288–94.
- 50) **Kaza AK, Kron IL, Leuwerke SM, et al.** Keratinocyte growth factor enhances post-pneumonectomy lung growth by alveolar proliferation. *Circulation* 2002;106(12 Suppl 1):I120-4.
- 51) **Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al.** Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005;121(6):823–35. Internet: doi:10.1016/j.cell.2005.03.032.

- 52) **Landesberg LJ, Ramalingam R, Lee K, et al.** Upregulation of transcription factors in lung in the early phase of postpneumectomy lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(5):L1138-49.
- 53) **Laros CD, Westermann CJ.** Dilatation, compensatory growth, or both after pneumectomy during childhood and adolescence. A thirty-year follow-up study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1987;93(4):570–6.
- 54) **Liu M, Post M.** Invited review: mechanochemical signal transduction in the fetal lung. *J. Appl. Physiol.* 2000;89(5):2078–84.
- 55) **Liu M, Skinner SJ, Xu J, et al.** Stimulation of fetal rat lung cell proliferation in vitro by mechanical stretch. *Am. J. Physiol.* 1992;263(3 Pt 1):L376-83.
- 56) **Luyet C, Burri PH, Schittny JC.** Suppression of cell proliferation and programmed cell death by dexamethasone during postnatal lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282(3):L477-83. Internet: doi:10.1152/ajplung.00406.2000.
- 57) **Massaro D, Teich N, Maxwell S, et al.** Postnatal development of alveoli. Regulation and evidence for a critical period in rats. *J. Clin. Invest.* 1985;76(4):1297–305. Internet: doi:10.1172/JCI112103.
- 58) **Massaro D, Massaro GD.** Invited Review: pulmonary alveoli: formation, the "call for oxygen," and other regulators. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2002;282(3):L345-58. Internet: doi:10.1152/ajplung.00374.2001.
- 59) **Massaro D, Massaro GD, Baras A, et al.** Calorie-related rapid onset of alveolar loss, regeneration, and changes in mouse lung gene expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004;286(5):L896-906. Internet: doi:10.1152/ajplung.00333.2003.
- 60) **Massaro GD, Massaro D.** Postnatal lung growth: evidence that the gas-exchange region grows fastest at the periphery. *Am. J. Physiol.* 1993;265(4 Pt 1):L319-22.

-
- 61) **Massaro GD, Massaro D.** Formation of pulmonary alveoli and gas-exchange surface area: quantitation and regulation. *Annu. Rev. Physiol.* 1996;58:73–92. Internet: doi:10.1146/annurev.ph.58.030196.000445.
- 62) **McBride JT.** Postpneumonectomy airway growth in the ferret. *J. Appl. Physiol.* 1985;58(3):1010–4.
- 63) **McBride JT.** Lung volumes after an increase in lung distension in pneumonectomized ferrets. *J. Appl. Physiol.* 1989;67(4):1418–21.
- 64) **McBride JT, Kirchner KK, Russ G, et al.** Role of pulmonary blood flow in postpneumonectomy lung growth. *J. Appl. Physiol.* 1993;73(6):2448–51.
- 65) **McGowan SE, Torday JS.** The pulmonary lipofibroblast (lipid interstitial cell) and its contributions to alveolar development. *Annu. Rev. Physiol.* 1997;59:43–62. Internet: doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.43.
- 66) **Motejl V.** Das Kompensatorische Lungenwachstum der C57Bl6/N-Maus - Quantität, Kinetik, Funktionalität *Dissertation.* Gießen: Justus-Liebig-Universität; 2005.
- 67) **Nakajima C, Kijimoto C, Yokoyama Y, et al.** Longitudinal follow-up of pulmonary function after lobectomy in childhood - factors affecting lung growth. *Pediatr. Surg. Int.* 1998;13(5-6):341–5.
- 68) **O'Hare KH, Sheridan MN.** Electron microscopic observations on the morphogenesis of the albino rat lung, with special reference to pulmonary epithelial cells. *Am. J. Anat.* 1970;127(2):181–205. Internet: doi:10.1002/aja.1001270205.
- 69) **Olson LE, Hoffman EA.** Lung volumes and distribution of regional air content determined by cine X-ray CT of pneumonectomized rabbits. *J. Appl. Physiol.* 1994;76(4):1774–85.
- 70) **Prigent C, Dimitrov S.** Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J. Cell. Sci.* 2003;116(Pt 18):3677–85. Internet: doi:10.1242/jcs.00735.

- 71) **Rannels DE.** Role of physical forces in compensatory growth of the lung. *Am. J. Physiol.* 1989;257(4 Pt 1):L179-89.
- 72) **Ravikumar P, Yilmaz C, Dane DM, et al.** Regional lung growth following pneumonectomy assessed by computed tomography. *J Appl Physiol* 2004;97(4):1567-74; discussion 1549. Internet: doi:10.1152/jappphysiol.00396.2004.
- 73) **Rawlins EL, Hogan BL.** Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development* 2006;133(13):2455–65. Internet: doi:10.1242/dev.02407.
- 74) **Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, et al.** The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell Stem Cell* 2009;4(6):525–34. Internet: doi:10.1016/j.stem.2009.04.002.
- 75) **Rüsse, Sinowatz.** Lehrbuch der Embryologie der Haustiere: *Parey*; 1998.
- 76) **Sakurai MK, Greene AK, Wilson J, et al.** Pneumonectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg* 2005;18(4):201–5. Internet: doi:10.1080/08941930591004485.
- 77) **Schiebler T, Schmidt W, editors.** Anatomie. Limitierte Sonderausgabe 2002: *Springer*; 2002.
- 78) **Schittny JC, Djonov V, Fine A, et al.** Programmed cell death contributes to postnatal lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18(6):786–93.
- 79) **Schittny JC, Mund SI, Stampanoni M.** Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294(2):L246-54. Internet: doi:10.1152/ajplung.00296.2007.
- 80) **Schnorr, Kressin.** Embryologie der Haustiere: *Enke Verlag*; 2006.
- 81) **Schultz CJ, Torres E, Londos C, et al.** Role of adipocyte differentiation-related protein in surfactant phospholipid synthesis by type II cells. *Am J*

- Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283(2):L288-96. Internet: doi:10.1152/ajplung.00204.2001.
- 82) **Schulz H, Johner C, Eder G, et al.** Respiratory mechanics in mice: strain and sex specific differences. *Acta Physiol. Scand.* 2002;174(4):367–75.
- 83) **Soutiere SE, Mitzner W.** Comparison of postnatal lung growth and development between C3H/HeJ and C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* 2006;100(5):1577–83. Internet: doi:10.1152/japplphysiol.00809.2005.
- 84) **Takeda S, Hsia CC, Wagner E, et al.** Compensatory alveolar growth normalizes gas-exchange function in immature dogs after pneumonectomy. *J Appl Physiol* 1999;86(4):1301–10.
- 85) **Thurlbeck WM.** Postnatal human lung growth. *Thorax* 1982;37(8):564–71.
- 86) **Thurlbeck WM, Angus GE.** Growth and aging of the normal human lung. *Chest* 1975;67(2 Suppl):3S-6S.
- 87) **Thurlbeck WM, Galaugher W, Mathers J.** Adaptive response to pneumonectomy in puppies. *Thorax* 1982;36(6):424–7.
- 88) **Vaccaro C, Brody JS.** Ultrastructure of developing alveoli. I. The role of the interstitial fibroblast. *Anat. Rec.* 1978;192(4):467–79. Internet: doi:10.1002/ar.1091920402.
- 89) **Voswinckel R, Ahlbrecht K, Wolff JC, et al.** [Pulmonary tissue regeneration -- a hope for the future]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2006;131(16):865–8. Internet: doi:10.1055/s-2006-939859.
- 90) **Voswinckel R, Motejl V, Fehrenbach A, et al.** Characterisation of post-pneumonectomy lung growth in adult mice. *Eur Respir J* 2004;24(4):524–32. Internet: doi:10.1183/09031936.04.10004904.
- 91) **Voswinckel R, Ziegelhoeffer T, Heil M, et al.** Circulating vascular progenitor cells do not contribute to compensatory lung growth. *Circ Res* 2003;93(4):372–9. Internet: doi:10.1161/01.RES.0000087643.60150.C2.

- 92) **Weibel ER, GOMEZ DM.** A principle for counting tissue structures on random sections. *Journal of applied physiology* 1962;17:343–8.
- 93) **Wood JP, Kolassa JE, McBride JT.** Changes in alveolar septal border lengths with postnatal lung growth. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 1):L1157-63.
- 94) **Wu EY, Hsia CC, Estrera AS, et al.** Preventing mediastinal shift after pneumonectomy does not abolish physiological compensation. *J Appl Physiol* 2000;89(1):182–91.
- 95) **Yamada M, Kurihara H, Kinoshita K, et al.** Temporal expression of alpha-smooth muscle actin and drebrin in septal interstitial cells during alveolar maturation. *J Histochem Cytochem* 2005;53(6):735–44. Internet: doi:10.1369/jhc.4A6483.2005.
- 96) **Zeltner TB, Burri PH.** The postnatal development and growth of the human lung. II. Morphology. *Respiration physiology* 1987;67(3):269–82.
- 97) **Zeltner TB, Caduff JH, Gehr P, et al.** The postnatal development and growth of the human lung. I. Morphometry. *Respiration physiology* 1987;67(3):247–67.
- 98) **Zhang S, Garbutt V, McBride JT.** Strain-induced growth of the immature lung. *J. Appl. Physiol.* 1996;81(4):1471–6.
- 99) **Gordon JW, Ruddle FH.** Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 1981;214:1244-1246.
- 100) **Capecchi MR.** Altering the genome by homologous recombination. *Science.* 1989;244:1288-1292.
- 101) **Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al.** Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 376:62-66.
- 102) **Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et. al.** Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 1995;268:1766-1769.
- 103) **Lantinga-van Leeuwen IS, Leonhard WN, van de Wal A, et al.** Transgenic mice expressing tamoxifen-inducible Cre for somatic gene modification in renal epithelial cells. *Genesis*, 2006;44:225-232.

-
- 104) **Perl AK, Tichelaar JW, Whitsett, JA.** Conditional gene expression in the respiratory epithelium of the mouse. *Transgenic Res.* 2002;11:21-29.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

| | |
|--------------------|---|
| 95% CI | 95% Konfidenz-Intervall |
| A. | Arteria |
| Abb. | Abbildung |
| ADFP | Adipocyte Differentiation-Related Protein |
| AF | Atemfrequenz |
| AK | Antikörper |
| α -SMA | α -Smooth Muscle Actin |
| BSA | Bovine Serum Albumine |
| cm | Zentimeter |
| cmH ₂ O | Zentimeter Wassersäule |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| COPD | chronisch obstruktive Lungenerkrankung |
| CPAP | continuous positive airway pressure |
| d | Tag |
| ddH ₂ O | zweifach destilliertes Wasser |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| E | Tag in der Embryonalentwicklung |
| EDTA | Ethyldiamintetraacetsäure |
| et al. | et altera |
| evtl. | eventuell |
| G | Gauge (Kanülengröße) |
| g | Gramm |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| gt | Goat – Ziege |
| h | Stunde |
| H ₂ O | molekulares Wasser |
| i.p. | intraperitoneal |
| ICR | Interkostalraum |
| IE | Internationale Einheit |

| | |
|----------------|--|
| IF | Immunfluoreszenz |
| k | Kilo |
| kg | Kilogramm |
| L_m | Mean Linear Intercept |
| M | Mol |
| Min | Minute |
| ml | Milliliter |
| μ l | Mikroliter |
| mM | Millimol |
| mm | Millimeter |
| μ m | Mikrometer |
| ms | Mouse – Maus |
| MW | Mittelwert |
| n | Anzahl |
| N.S. | nicht signifikant |
| NaCl | Natriumchlorid |
| nm | Nanometer |
| O ₂ | molekularer Sauerstoff |
| P | Signifikanz |
| P | Tag nach Geburt |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PDGF | Platelet-derived Growth Factor |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| PNX | Pneumektomie |
| postOP | postoperativ |
| pPNX | post-Pneumektomie |
| präOP | präoperativ |
| proSP-C | Pro Surfactant Protein-C |
| pSH | post-Sham Operation |
| rb | Rabbit - Hase |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |

| | |
|----------------|--|
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| SEM | Standart error of the mean (Standartfehler des Mittelwertes) |
| SSW | Schwangerschaftswoche |
| T ₃ | Trijodthyronin |
| T ₄ | Thyroxin |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TV | Tidalvolumen |
| W | Watt |
| | |
| α | Alpha |
| β | Beta |
| δ | Delta |
| κ | Kappa |
| μ | Mikro |
| n | Nano |
| | |
| ® | eingetragene Marke |
| Ø | Durchschnitt / nicht |
| % | pro cent |
| °C | Grad Celsius |

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

9 Danksagung

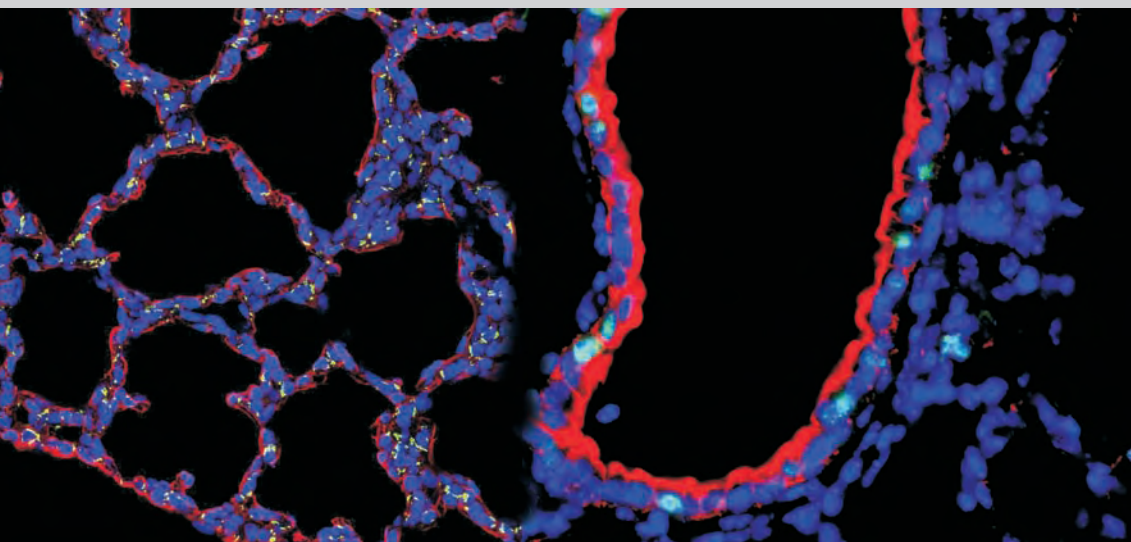
Für die hervorragende persönliche Betreuung meiner Doktorarbeit möchte ich besonders Herrn Dr. Robert Voswinckel sehr danken. Die kontinuierliche, kompetente Unterstützung und zuverlässige Hilfe in jeder Hinsicht weiß ich sehr zu schätzen.

Herrn Prof. Dr. Werner Seeger danke ich für die Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung der Labore, Geräte und Materialien, die mir die Durchführung der praktischen Arbeit ermöglichten.

Großer Dank gilt Dr. Kathrin Ahlbrecht, Dr. Machteld van Amerongen, Dipl. biol. Sven Becker, Nilifer Cevik, Dr. Isabel Dessureault, Dr. Felix Engel, Diana Fuchs, Prof. Dr. Sawa Kostin, Dr. Karsten grosse Kreymborg, Dipl. Ing./Msc. biol. Sandeep Nikam, Dr. Vandana Nikam, Ulrike Seay, Dipl. biol. Kirsten Szelepusa und Dr. Jens-Christian Wolff vom Max-Planck-Institut sowie Sabine Graef-Hoechst und Karin Quanz vom Labor Prof. Seeger der Medizinischen Klinik 2 für die gute Zusammenarbeit und unzählige Hilfestellungen.

Für die kritische Lektüre dieser Arbeit und konstruktive Kritik danke ich Mira Colsman und Dr. Jens-Christian Wolff.

Meinen Eltern Ulrike und Bernhard Schäfer danke ich für die Unterstützung meines Studiums und das stetige Interesse an dieser Arbeit.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5692-6



9 783835 193692 6